



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets<sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/82, 15/53, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/45549</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 4 décembre 1997 (04.12.97)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/00948 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 30 mai 1997 (30.05.97)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/06760 31 mai 1996 (31.05.96) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (FR/FR); 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> FAYE, Loïc (FR/FR); 3056, rue des Canadiens, F-76160 Saint-Jacques-sur-Darnetal (FR). GOMORD, Véronique-Martine (FR/FR); Résidence "Le Cambridge", Appartement 41, 51, rue J. Boutrolles, F-76130 Mont-Saint-Aignan (FR). KIEFER-MEYER, Marie-Christine (FR/FR); Résidence "Les Vergers", 7, rue Lefort, Gonssolin, F-76130 Mont-Saint-Aignan (FR). O'CONNEL, Ann [GB/GB]; 7 Coniston Court, Hangir Hill, Weybridge, Surrey KT13 9WR (GB).  <b>(74) Mandataires:</b> DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier & Demachy S.A.R.L., 103, rue La Fayette, F-75481 Paris Cedex 10 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> DNA SEQUENCES CODING FOR LACCASES, AND THEIR APPLICATIONS IN THE FIELD OF PLANT LIGNIN CONTENT CONTROL.  <b>(54) Titre:</b> SEQUENCES D'ADN CODANT POUR DES LACCASES, ET LEURS APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE LA REGULATION DES TENEURS EN LIGNINES DES PLANTES  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention discloses any DNA sequence containing, as coding region, all or part of the nucleotide sequence coding for an mRNA coding for a laccase, or all or part of the complementary nucleotide sequence of the latter and coding for an antisense mRNA capable of being hybridized with the above mentioned mRNA. The invention also discloses the use of the above mentioned sequences for implementing methods of controlling lignin biosynthesis in plants.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne toute séquence d'ADN comprenant à titre de région codante, tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant pour une laccase, ou tout ou partie de la séquence nucléotidique complémentaire de cette dernière et codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné. L'invention vise également l'utilisation des séquences susmentionnées pour la mise en œuvre de procédés de régulation de la biosynthèse de lignines chez les plantes.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
RJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## SEQUENCES D'ADN CODANT POUR DES LACCASES, ET LEURS APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE LA REGULATION DES TENEURS EN LIGNINES DES PLANTES.

---

5

La présente invention a pour objet l'utilisation de séquences d'ADN codant pour des laccases chez les plantes, ou de tout fragment de ces séquences, ou encore de toute séquence dérivée de ces dernières, ou de leurs séquences complémentaires, dans le cadre de la mise en oeuvre de procédés de régulation du taux de lignine chez les plantes.

Les laccases (p. diphenol : O<sub>2</sub> oxydoreductase, EC 1.10.3.2) oxydent des substrats phénoliques en utilisant l'oxygène en tant qu'accepteur d'électron. Ce sont des glycoprotéines fixant quatre ions cuivre, qui constituent avec l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine, un groupe de métallo-enzymes appelé les "oxydases bleues, à cuivre" (Messerschmidt and Huber, 1990 ; Ryden and Hunt, 1993).

Tout d'abord identifiées dans l'arbre à laque du Japon (*Rhus vernicifera*), il a ensuite été montré que les laccases sont réparties dans de nombreux organismes (champignons, plantes supérieures, insectes et bactéries), et beaucoup de fonctions différentes leur ont été attribuées (Dean and Eriksson, 1994).

Chez les plantes, l'unique fonction attribuée aux laccases est celle de leur probable implication dans la polymérisation oxydative de composés phénoliques dans le cadre de la biosynthèse de lignine.

Bien que l'implication des laccases dans la lignification a été remise en question pendant des années, plusieurs études récentes ont abouti à reconsidérer leur rôle dans ce processus (Driouich et al., 1992 ; O'Malley et al., 1993 ; Dean and Eriksson, 1994).

A l'heure actuelle, le mécanisme enzymatique exact de la polymérisation des monolignols lors de la formation des lignines, demeure inconnu. Une approche possible permettant de clarifier le rôle de ces enzymes est de réguler (soit dans le sens d'une diminution, soit dans le sens d'une augmentation), l'expression des gènes correspondants dans des plantes transgéniques et de rechercher les différences résultantes en teneur et/ou en composition des lignines chez ces plantes transformées par rapport à des plantes non transformées.

Une telle approche a déjà été expérimentée avec le gène d'une peroxydase anionique et avec différents gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des lignines (Boudet et al., 1995).

Ces enzymes susmentionnées impliquées dans la biosynthèse des lignines, sont principalement l'O-méthyl transférase (OMT), la cinnamyl alcool deshydrogénase (CAD) et la cinnamoyl CoA réductase (CCR).

Les lignines sont des polymères de monolignols, et les trois enzymes citées ci-dessus sont impliquées dans la biosynthèse des monolignols.

Ces approches ont été réalisées au cours des dernières années dans la perspective de modifier qualitativement et/ou quantitativement les lignines dans les plantes fourragères et les espèces ligneuses utilisées pour la production de pâte à papier. Les objectifs principaux de ces études étaient respectivement d'améliorer la digestibilité des fourrages et de réduire les pollutions liées au blanchiment des pâtes à papier.

Les laccases quant à elles, agissent sur les étapes ultérieures extracellulaires d'assemblage de ces monolignols.

Toutefois, aucune approche tentant de vérifier l'influence que pourrait avoir un procédé de diminution ou d'augmentation de l'expression de gènes codant pour des laccases sur la quantité et la qualité des lignines produites par des plantes transformées, n'a été effectuée jusqu'à maintenant.

Seuls des ADNc codant pour des laccases ont été isolés à partir de sycomore (Delaunay et al., 1994 ; La Fayette et al., 1995).

Mais la transformation génétique du sycomore n'étant pas encore réalisable, aucune conclusion n'a pu être apportée par ces travaux sur l'influence possible de la régulation de l'expression du gène de ces laccases sur la teneur et la qualité des lignines produites.

L'un des buts de la présente invention est celui de fournir un procédé permettant de modifier les lignines des plantes, cette modification intervenant au niveau de la composition et/ou de la quantité des lignines produites.

La présente invention a plus particulièrement pour but de fournir un procédé permettant de réguler efficacement les teneurs en lignines dans les plantes, soit dans le sens d'une diminution sensible de ces teneurs par rapport aux teneurs normales dans les plantes, soit dans le sens d'une augmentation de ces teneurs.

Un autre but de la présente invention est de fournir les outils pour la mise en oeuvre d'un tel procédé, et plus particulièrement des constructions utilisables pour la transformation de plantes.

Un autre but de la présente invention est de fournir des plantes transformées génétiquement, notamment des plantes fourragères susceptibles d'être mieux digérées que les plantes non transformées, ou encore des plantes ou arbres transformés pour la production de la pâte à papier, et dont

l'extraction des lignines serait facilitée et moins polluante que dans le cas d'arbres non transformés.

Un autre but de la présente invention est celui de fournir des plantes transformées davantage résistantes à des attaques de l'environnement, notamment à des attaques parasitaires, que ne le sont les plantes non transformées, ou encore des plantes transformées de plus grande taille, ou de taille plus réduite (que celle des plantes non transformées).

L'invention est illustrée à l'aide des figures 1 à 5 suivantes :

- figure 1 : représentation de la construction du plasmide pBKTL8 conçu pour sur-exprimer un gène codant pour une laccase; il a été réalisé à partir de SEQ ID NO 1, à savoir à partir d'une séquence complète d'ADNc codant une laccase de tabac (séquence codante et extrémités 5' et 3' non codantes de l'ADNc),

- figure 2 : représentation de la construction du plasmide pMBKTL correspondant au plasmide pBKTL8 présenté dans la figure 1 dans lequel le site de restriction NcoI situé en amont de la séquence codant la laccase de tabac, a été éliminé,

- figure 3 : représentation de la construction du plasmide pNKTL conçu pour sur-exprimer un gène codant pour une laccase; il a été réalisé à partir de la séquence d'ADNc codant une laccase de tabac délimitée par les nucléotides situés aux positions 82 et 1755 de SEQ ID NO 1 (clonage de la région codante uniquement).

- figure 4 : représentation de la construction des plasmides pHS1 et pHS16 conçus pour diminuer l'expression du (des) gène(s) codant pour la (les) laccase(s); ils ont été réalisés à partir d'une séquence partielle d'ADNc codant une laccase de tabac, à savoir la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 292 et 1766, qui a été clonée en orientation sens dans le cas du plasmide pHS16 et en orientation antisens dans le cas du plasmide pHS1.

- figure 5 : représentation de la construction du plasmide pES22 conçu pour diminuer l'expression du (des) gène(s) codant pour la (les) laccase(s); il a été réalisé à partir de SEQ ID NO 1, à savoir à partir d'une séquence complète d'ADNc codant une laccase de tabac (séquence codante et extrémités 5' et 3' non codantes de l'ADNc) qui a été clonée en orientation antisens.

La présente invention a pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques recombinantes contenant une (ou plusieurs) région(s) codante(s), cette (ces) région(s) codante(s) étant constituée(s) :

- d'une séquence nucléotidique codant pour un ARN messager (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou d'un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour

un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase, ou d'une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée d'une laccase, ou

- d'une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou complémentaire d'un fragment d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, ou complémentaire d'une séquence nucléotidique dérivée, soit d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, soit d'un fragment de cette dernière, cette séquence complémentaire codant pour une séquence nucléotidique antisens (encore désignée ARNm antisens) susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes,

pour la transformation de cellules végétales en vue de l'obtention de plantes transgéniques au sein desquelles la biosynthèse des lignines est régulée soit dans le sens d'une augmentation, soit dans le sens d'une diminution des teneurs en lignines produites, par rapport aux teneurs normales en lignines produites chez les plantes non transformées, et/ou dans le sens d'une modification de la composition (et donc des caractéristiques physicochimiques de ces dernières, telles que l'extraction par les solvants habituellement utilisés dans l'industrie papetière) des lignines produites par lesdites plantes transgéniques par rapport aux lignines produites chez les plantes non transformées.

Par l'expression "séquence nucléotidique dérivée", dans ce qui précède et ce qui suit, on entend toute séquence présentant au moins environ 60 % (et plus particulièrement au moins environ 80 %) de nucléotides identiques à ceux de la séquence dont elle dérive.

Par "protéine dérivée" dans ce qui précède et ce qui suit, on entend toute protéine présentant au moins environ 50 % (et plus particulièrement au moins environ 70 %) d'acides aminés homologues à ceux de la protéine dont elle dérive.

Parmi les séquences nucléotidiques susceptibles d'être contenues dans les séquences nucléotidiques recombinantes susmentionnées, on peut citer principalement:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la laccase de tabac représentée par SEQ ID NO 2,

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 3, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase de tabac, ce fragment étant représenté par SEQ ID NO 4,

5 - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase de tabac, ce fragment étant représenté par SEQ ID NO 6,

- la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec  
10 un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, et plus particulièrement avec l'ARNm codé par les séquences SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, et SEQ ID NO 5 respectivement,

- la séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5, notamment par mutation  
15 et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant soit pour un ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou pour les fragments de laccase représentés par SEQ ID NO 4, ou SEQ ID NO 6, soit pour une protéine dérivée de la laccase ou fragments de laccase susmentionnés,

20 - la séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique complémentaire susmentionnée, par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, et plus particulièrement avec  
25 un des ARNm susmentionnés.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par  
30 SEQ ID NO 2, ou

- un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 1 susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de  
35 cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou pour une protéine dérivée de cette dernière.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 3, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase de tabac, ce fragment étant représenté par SEQ ID NO 4, ou

- un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la laccase représentée par SEQ ID NO 4, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 3, susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour le fragment de laccase représenté par SEQ ID NO 4, ou pour une protéine dérivée de ce dernier.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase de tabac, ce fragment étant représenté par SEQ ID NO 6, ou

- un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la laccase représentée par SEQ ID NO 6, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 5, susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour le fragment de laccase représenté par SEQ ID NO 6, ou pour une protéine dérivée de ce dernier.

Par les expressions "fragments de laccase" ou "protéines dérivées" dans ce qui précède et ce qui suit, on entend toute protéine possédant une activité de polymérisation des monolignols en l'absence de peroxyde d'hydrogène telle que mesurée selon la méthode de Sterjiades et al. (1992) publiée dans Plant Physiology, 99 ; 1162 - 1168.

L'invention a également pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, à savoir avec



l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 1, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

- un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, tel que défini ci-dessus, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 3, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 4, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 3, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

- un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 4, telle que définie ci-dessus, ou

- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

La présente invention a plus particulièrement pour objet toute séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 5, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm

codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 6, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 5, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

5 - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 6, telle que définie ci-dessus, ou

10 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

15 Il va de soi que les séquences représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, et SEQ ID NO 5, les séquences complémentaires, les séquences dérivées et les fragments de séquences de l'invention mentionnées ci-dessus, doivent être pris en considération comme étant représentées dans le sens 5' → 3'.

20 Ainsi, le premier nucléotide d'une séquence complémentaire dans le sens 5' → 3' telle que décrite ci-dessus, est le complément du dernier nucléotide de la séquence dans le sens 5' → 3' codant pour une laccase (ou fragment de laccase ou protéine dérivée), le second nucléotide de cette séquence complémentaire est le complément de l'avant-dernier nucléotide de la séquence codant pour une laccase, et ainsi de suite, jusqu'au dernier nucléotide de ladite séquence complémentaire qui est le complément du premier nucléotide de la séquence codant pour une laccase.

25 L'ARNm codé par la séquence complémentaire susmentionnée est tel que, lorsque cet ARNm est représenté dans le sens 5' → 3', son premier nucléotide correspond au dernier nucléotide de la séquence codant pour une laccase, et donc s'hybride avec le dernier nucléotide de l'ARNm codé par cette dernière, tandis que son dernier nucléotide correspond au premier nucléotide de la séquence codant pour une laccase, et donc s'hybride avec le premier nucléotide de l'ARNm codé par cette dernière.

30 L'ARNm codé par la séquence complémentaire susmentionnée est tel que, lorsque cet ARNm est représenté dans le sens 5' → 3', son premier nucléotide correspond au dernier nucléotide de la séquence codant pour une laccase, et donc s'hybride avec le dernier nucléotide de l'ARNm codé par cette dernière, tandis que son dernier nucléotide correspond au premier nucléotide de la séquence codant pour une laccase, et donc s'hybride avec le premier nucléotide de l'ARNm codé par cette dernière.

35 Ainsi, on entend par ARNm antisens dans ce qui précède et ce qui suit, tout ARNm codé par la susdite séquence complémentaire et représenté dans le sens inverse (3' → 5') du sens dans lequel est représenté l'ARNm codé par la séquence codant pour une laccase (ou fragment de laccase ou protéine dérivée), ce dernier ARNm étant encore désigné ARNm sens (5' → 3').

Le terme d'ARN antisens s'adresse donc à une séquence d'ARN complémentaire de la séquence en bases de l'ARN messager, le terme complémentaire devant être compris en ce sens que chaque base (ou une majorité de bases) de la séquence antisens (lue dans le sens 3' → 5') est capable de s'apparier avec les bases correspondantes (G avec C, A avec U) de l'ARN messager (séquence lue dans le sens 5' → 3').

La stratégie des ARN antisens, dans le cadre de la présente invention, est une approche moléculaire particulièrement adaptée à l'objectif d'une modulation des taux de lignines des plantes. L'ARN antisens est un ARN produit par la transcription du brin d'ADN non codant (brin non-sens).

Cette stratégie antisens est plus particulièrement décrite dans le brevet européen n° 240 208.

L'invention concerne également tout ARNm codé par une séquence d'ADN selon l'invention, et plus particulièrement:

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 1, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la laccase présente chez le tabac, telle que représentée par SEQ ID NO 2, ou pour un fragment de cette laccase ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus,

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 3, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour le fragment d'une laccase présente chez le tabac, telle que représentée par SEQ ID NO 4, ou pour un fragment de ce dernier ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus,

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 5, ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour le fragment d'une laccase présente chez le tabac, telle que représentée par SEQ ID NO 6, ou pour un fragment de ce dernier ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus.

L'invention a également pour objet tout ARNm antisens, tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend des nucléotides complémentaires de la totalité ou d'une partie seulement des nucléotides constituant un ARNm tel que décrit ci-dessus selon l'invention, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider (ou de s'apparier) avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment avec un ARNm tel que décrit ci-dessus.

A ce titre, l'invention vise plus particulièrement les ARNm antisens codés par des séquences d'ADN selon l'invention, comprenant au moins une

région de 100 bases homologues à celles d'une région des séquences complémentaires des séquences d'ADN susmentionnées de l'invention.

Il n'y a pas de limite supérieure de taille pour les séquences d'ADN codant pour un ARN antisens selon l'invention; elles peuvent être aussi  
5 longues que celles du messager normalement produit dans les cellules, voire aussi longues que la séquence d'ADN génomique codant pour l'ARNm d'une laccase.

L'invention a plus particulièrement pour objet:

- tout ARNm antisens, tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est  
10 codé par la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 1,

- tout ARNm antisens, tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est  
15 codé par la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 3, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 3,

- tout ARNm antisens, tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est  
20 codé par la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 5, ledit ARNm antisens étant susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 5.

L'invention concerne également les polypeptides recombinants codés par  
25 les séquences d'ADN de l'invention, lesdits polypeptides recombinants présentant, le cas échéant, une activité de polymérisation des monolignols chez les plantes, et plus particulièrement les polypeptides recombinants représentés par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, et SEQ ID NO 6, codés respectivement par les séquences représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, et SEQ ID NO  
30 5, ou par des séquences dérivées de ces dernières selon l'invention.

L'invention a plus particulièrement pour objet les polypeptides  
recombinants, et notamment les laccases recombinantes, tels qu'obtenus par transformation de cellules végétales en intégrant de façon stable dans leur  
génom, une séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-après,  
35 contenant une séquence d'ADN selon l'invention, notamment à l'aide d'un vecteur tel que décrit ci-après.

Par l'expression "polypeptides recombinants", on doit entendre toute molécule possédant une chaîne polypeptidique susceptible d'être produite par génie génétique, par l'intermédiaire d'une phase de transcription de l'ADN du

gène correspondant, ce qui conduit à l'obtention d'ARN qui est par la suite transformé en ARNm (par suppression des introns), ce dernier étant ensuite traduit par les ribosomes, sous forme de protéines, le tout étant effectué sous contrôle d'éléments de régulation appropriés à l'intérieur d'une cellule hôte. Par conséquent, l'expression "polypeptides recombinants" utilisée n'exclut pas la possibilité que lesdits polypeptides comprennent d'autres groupements, tels que les groupements glycosylés.

Bien entendu, le terme "recombinant" indique que le polypeptide a été produit par génie génétique, car il résulte de l'expression, dans un hôte cellulaire approprié, de la séquence nucléotidique correspondante qui a été auparavant introduite dans un vecteur d'expression utilisé pour transformer ledit hôte cellulaire. Toutefois, ce terme "recombinant" n'exclut pas la possibilité que le polypeptide soit produit par un procédé différent, par exemple par synthèse chimique classique selon les méthodes connues utilisées pour la synthèse de protéines, ou par clivage protéolytique de molécules de plus grande taille.

L'invention concerne plus particulièrement les laccases de tabac telles qu'obtenues sous forme essentiellement pure par extraction et purification à partir de tabac, et plus particulièrement la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou celle comprenant le polypeptide représenté par SEQ ID NO 4, ou encore celle comprenant le polypeptide représenté par SEQ ID NO 6, ou toute protéine dérivée de ces dernières, notamment par addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou tout fragment issu desdites laccases ou de leurs séquences dérivées.

L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou pour les polypeptides représentés par SEQ ID NO 4, et SEQ ID NO 6, ou toute séquence dérivée ou fragment de ces derniers, tels que définis ci-dessus, lesdites séquences nucléotidiques étant caractérisées en ce qu'elles correspondent à tout ou partie des séquences représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5, respectivement, ou à toute séquence dérivée de ces dernières par dégénérescence du code génétique, et étant néanmoins susceptibles de coder pour les laccases ou séquence dérivée ou fragment de ces dernières, tels que définis ci-dessus.

L'invention vise également les complexes formés entre les ARNm antisens, tels que décrits ci-dessus, et les ARNm selon l'invention, susceptibles de coder pour tout ou partie d'une laccase chez les plantes.

L'invention a plus particulièrement pour objet le complexe formé entre l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO 1 et l'ARNm antisens codé par la

séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO 1, celui formé entre l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO 3 et l'ARNm antisens codé par la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO 3, ainsi que celui formé entre l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO 5 et l'ARNm antisens codé par la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID NO 5.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante contenant une (ou plusieurs) région(s) codante(s), cette (ces) région(s) codante(s) étant constituée(s):

- d'une séquence nucléotidique codant pour un ARN messager (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou d'un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase chez les plantes, ou d'une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée de la laccase, ou

- d'une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou complémentaire d'un fragment d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, ou complémentaire d'une séquence nucléotidique dérivée, soit d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, soit d'un fragment de cette dernière, cette séquence complémentaire codant pour une séquence nucléotidique antisens (encore désignée ARNm antisens) susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique recombinante (ou ADN recombinant), caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'ADN selon l'invention, choisie parmi celles décrites ci-dessus, ladite séquence d'ADN étant insérée dans une séquence hétérologue.

L'invention concerne plus particulièrement toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, comprenant la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, ou par SEQ ID NO 3, ou par SEQ ID NO 5, ou tout fragment ou une séquence nucléotidique dérivée de ces dernières, tels que définis ci-dessus, lesdites séquences nucléotidiques ou ledit fragment étant insérés dans une séquence hétérologue, et étant susceptibles de coder pour le polypeptide représentée par SEQ ID NO 2, ou par SEQ ID NO 4, ou par SEQ ID NO 6, respectivement, ou pour un fragment de ces polypeptides, ou pour une protéine dérivée de ces derniers, tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement encore, toute séquence nucléotidique recombinante comprenant une séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, ou par SEQ ID NO 3, ou par SEQ ID NO 5, ou tout fragment ou toute séquence nucléotidique  
5 dérivée de cette séquence complémentaire, tels que définis ci-dessus, lesdites séquences complémentaires ou ledit fragment étant insérés dans une séquence hétérologue, et étant susceptibles de coder pour un ARNm antisens capable de s'hybrider avec tout ou partie de l'ARNm codant pour une laccase chez les plantes, et plus particulièrement avec tout ou partie de l'ARNm codant pour la  
10 laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou pour les fragments de laccase représentés par SEQ ID NO 4, ou par SEQ ID NO 6, respectivement.

Les ADN recombinants selon l'invention sont davantage caractérisés en ce qu'ils comprennent les éléments nécessaires pour réguler l'expression de la séquence nucléotidique codant pour tout ou partie d'une laccase selon  
15 l'invention, ou de sa séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens selon l'invention, notamment un promoteur et un terminateur de la transcription de ces séquences.

Parmi les différents promoteurs susceptibles d'être utilisés dans les constructions d'ADN recombinants selon l'invention, on peut citer:

- 20 - le promoteur endogène contrôlant l'expression de la laccase chez une plante, notamment le promoteur situé en amont de la séquence représentée par SEQ ID NO 1, ou SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5 chez le tabac, ou
- des promoteurs de type constitutif à forte expression, tels que, par exemple, le promoteur 35S du CAMV (décrit dans Benfey et al. (1990),  
25 EMBO J., 9 (6), 1677-1684),
- des promoteurs de type spécifique à expression particulière dans des tissus individuels.

L'invention concerne également toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, et comprenant également au moins  
30 une séquence nucléotidique codant pour tout ou partie d'un ARNm codant lui-même pour une autre enzyme que la laccase, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment l'ARNm codant pour l'alcool cinnamylique deshydrogénase (CAD), et/ou l'ARNm codant pour la cinnamoyl CoA réductase (CCR), et/ou l'ARNm codant pour  
35 l'O-méthyltransférase (OMT), ou comprenant également au moins une séquence nucléotidique codant pour tout ou partie d'un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné, notamment avec l'ARNm codant pour la CAD, la CCR ou l'OMT.

L'invention a également pour objet tout vecteur recombinant, utilisable pour la transformation de plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique recombinante choisie parmi celles décrites ci-dessus, selon l'invention, intégrée dans l'un des sites de son génome non essentiels pour sa réplication.

La présente invention a également pour objet un procédé de régulation de la biosynthèse des lignines chez les plantes, soit par diminution, soit par augmentation des quantités de lignines produites, par rapport aux quantités normales de lignines produites chez ces plantes, ledit procédé comprenant une étape de transformation de cellules de ces plantes à l'aide d'un vecteur contenant:

- une séquence nucléotidique codant pour un ARN messager (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase, ou une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée d'une laccase, ou

- une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou complémentaire d'un fragment d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, ou complémentaire d'une séquence nucléotidique dérivée, soit d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, soit d'un fragment de cette dernière, cette séquence complémentaire codant pour une séquence nucléotidique antisens (encore désignée ARNm antisens) susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes,

ladite transformation étant effectuée notamment à l'aide d'un vecteur tel que décrit ci-dessus.

La présente invention a plus particulièrement pour objet un procédé de diminution des quantités de lignine produites chez les plantes, par rapport aux quantités normales de lignines produites chez ces plantes, ledit procédé comprenant une étape de transformation de cellules de ces plantes à l'aide d'un vecteur contenant :

- une séquence nucléotidique codant pour un ARN messager (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase, ou une



séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation, et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée d'une laccase, ou

- une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou complémentaire d'un fragment d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, ou complémentaire d'une séquence nucléotidique dérivée, soit d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, soit d'un fragment de cette dernière, cette séquence complémentaire codant pour une séquence nucléotidique antisens (encore désignée ARNm antisens) susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes,

ladite transformation étant effectuée notamment à l'aide d'un vecteur tel que décrit ci-dessus.

La présente invention a plus particulièrement pour objet un procédé de diminution des quantités de lignines produites chez les plantes, par rapport aux quantités normales de lignines produites chez ces plantes, ledit procédé comprenant une étape de transformation de cellules de ces plantes à l'aide d'un vecteur contenant une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou complémentaire d'un fragment d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, ou complémentaire d'une séquence nucléotidique dérivée, soit d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, soit d'un fragment de cette dernière, cette séquence complémentaire codant pour une séquence nucléotidique antisens (encore désignée ARNm antisens) susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes,

ladite transformation étant effectuée notamment à l'aide d'un vecteur tel que décrit ci-dessus.

A ce titre, invention a plus particulièrement pour objet un procédé de diminution de la quantité de lignines produite par biosynthèse chez les plantes, ce procédé étant effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

- au moins une séquence d'ADN selon l'invention telle que décrite ci-dessus, codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec tout ou partie de l'ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou pour un fragment de laccase représenté par SEQ ID NO 4, ou SEQ ID NO 6, ou pour une protéine dérivée de ces derniers telle que définie ci-dessus,

- et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la laccase, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment l'ARNm codant pour la CAD, la CCR ou l'OMT,

ladite transformation étant réalisée:

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus, contenant une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider avec l'ARNm codant pour une laccase ou pour une protéine dérivée, telle que définie ci-dessus, et, le cas échéant, contenant une ou plusieurs séquence(s) d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la laccase telle que définie ci-dessus,

- soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins contient une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider avec l'ARNm codant pour une laccase ou pour une protéine dérivée, telle que définie ci-dessus, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la laccase, telle que définie ci-dessus.

Un autre procédé de diminution de la quantité de lignines produites par biosynthèse chez les plantes, est celui réalisé par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant une séquence nucléotidique codant pour un ARN messager ARN(m), cet ARN(m) codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase, ou une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée d'une laccase.

Cette dernière méthode fait appel au mécanisme de co-suppression. La co-suppression a été observée quand des copies du gène endogène ont été introduites dans le génome. Bien que le mécanisme de la co-suppression soit actuellement inconnu, une des hypothèses les plus fréquemment retenue est que la régulation négative de l'expression du gène viendrait de la production d'une faible proportion d'ARN antisens dérivée d'un transgène à travers une lecture du "mauvais" brin du transgène (Grierson et al., Trends Biotech., 9: 122-123).

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de diminution de la quantité de lignines produites par biosynthèse chez les plantes, ce procédé étant effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant :

5           - au moins une séquence d'ADN selon l'invention représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus,

          - et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une autre enzyme que la laccase, qui se trouve être impliquée dans  
10           une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment une séquence d'ADN codant pour tout ou partie de la CAD, ou de la CCR, ou de l'OMT.

ladite transformation étant réalisée:

          - soit à l'aide d'un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus,  
15           contenant la séquence d'ADN selon l'invention susmentionnée, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, et, le cas échéant, contenant une ou plusieurs séquence(s) d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la laccase, telle que définie ci-dessus,

          - soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins  
20           contient une séquence d'ADN selon l'invention susmentionnée, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la laccase, telle que définie ci-dessus.

25           Il est important de noter que les méthodes susmentionnées permettent d'aboutir à des plantes transformées présentant des niveaux différents de réduction de l'activité des laccases (selon le niveau d'insertion de la séquence d'ADN codant pour l'ARNm antisens, le nombre de copies de cette séquence d'ADN intégrée dans le génome...), et donc des teneurs en lignines.

30           Le choix des transformants permettra donc une modulation contrôlée des teneurs en lignines compatible avec un développement normal de la plante.

          D'une manière générale, si l'on considère que la teneur moyenne normale en lignines d'une plante varie entre environ 15% et environ 35% en poids de matière sèche, la réduction de la teneur en lignines résultant de la  
35           mise en oeuvre d'un des procédés susmentionnés, est avantageusement telle que les plantes ainsi transformées présentent une teneur moyenne en lignines réduite d'au moins environ 2 à 3 % par rapport à la teneur moyenne normale en lignines d'une plante non transformée.

A titre d'illustration, la teneur en lignines d'une plante peut être mesurée selon les méthodes décrites par Effland (1977) dans Tappi, 60, 143-144, ou par Iiyama et Wallis (1990) dans J. Sci. Food Agric., 51, 145-161.

L'invention vise plus particulièrement l'application des procédés susmentionnés de diminution des teneurs en lignines dans les plantes, à l'obtention de plantes fourragères transformées génétiquement, présentant des teneurs en lignines réduites par rapport aux teneurs normales en lignines chez ces plantes, et dont la digestibilité se trouve être ainsi améliorée par rapport à ces mêmes plantes non transformées.

Parmi les principales plantes fourragères susceptibles d'être transformées dans le cadre de la présente invention, on peut citer: la luzerne, la fétuque, le maïs destiné à l'ensilage, etc...

L'invention concerne également l'application des procédés susmentionnés de diminution des teneurs en lignines chez les plantes, à l'obtention de plantes, et plus particulièrement d'arbres, transformés génétiquement, présentant des teneurs en lignines réduites par rapport aux teneurs normales en lignines chez ces plantes, ces plantes ou arbres étant particulièrement avantageux à utiliser dans le cadre de la production de la pâte à papier.

Un troisième domaine potentiel d'application des procédés susmentionnés de régulation négative de l'expression du gène de la laccase, concerne la stimulation de la croissance des plantes transformées. Il semble en effet qu'une lignification précoce et rapide soit un frein au grandissement cellulaire et donc à la croissance des végétaux. Ainsi la mise en oeuvre des procédés susmentionnés est susceptible de permettre pour les plantes ainsi transformées à lignification réduite une meilleure croissance et donc de meilleurs rendements.

L'invention concerne également un procédé d'augmentation de la quantité de lignines produites par biosynthèse chez les plantes, ce procédé étant effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant une séquence nucléotidique codant pour un ARN messenger (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase, ou une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée d'une laccase.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement un procédé d'augmentation de la quantité de lignines produites par biosynthèse chez les plantes, ce procédé étant effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant :

5           - au moins une séquence d'ADN selon l'invention représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus,

          - et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une autre enzyme que la laccase, qui se trouve être impliquée dans  
10           une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment une séquence d'ADN codant pour tout ou partie de la CAD, et/ou de la CCR, et/ou de l'OMT,

          ladite transformation étant réalisée:

          - soit à l'aide d'un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus,  
15           contenant la séquence d'ADN selon l'invention susmentionnée, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, et, le cas échéant, contenant une ou plusieurs séquence(s) d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la laccase, telle que définie ci-dessus,

          - soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins  
20           contient une séquence d'ADN selon l'invention susmentionnée, ou un fragment ou une séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la laccase, telle que définie ci-dessus.

25           D'une manière générale, toujours si l'on considère que la teneur moyenne normale en lignines d'une plante varie entre environ 15% et environ 35% en poids de matière sèche, l'augmentation de la teneur en lignines résultant de la mise en oeuvre du procédé susmentionné, est avantageusement telle que les plantes ainsi transformées présentent une teneur moyenne en  
30           lignines augmentée d'au moins environ 2 à 5 % par rapport à la teneur moyenne normale d'une plante non transformée.

          L'invention vise plus particulièrement l'application du procédé susmentionné d'augmentation des teneurs en lignines dans les plantes (encore désigné procédé de surexpression du gène de la laccase), à l'obtention de  
35           plantes transformées génétiquement, présentant des teneurs en lignines augmentées par rapport aux teneurs normales en lignines chez ces plantes, et dont les propriétés de résistance à des attaques de l'environnement, notamment à des attaques parasitaires, se trouvent être ainsi améliorées par rapport à ces mêmes plantes non transformées. Il est particulièrement avantageux dans ce

dernier cas, d'utiliser en association avec le gène de la laccase, ou une séquence dérivée, dans les vecteurs susmentionnés, des promoteurs spécifiques particulièrement exprimés dans les tissus de surface et/ou en réponse à la blessure.

5 Par ailleurs, l'invention concerne également l'application du procédé susmentionné de surexpression du gène de la laccase, à l'amélioration de la croissance des plantes ainsi transformées génétiquement, notamment dans certains domaines tels que l'horticulture ou l'arboriculture, où il est souhaitable d'obtenir des plantes de dimension réduite.

10 Enfin, les cycles benzéniques de la lignine ont une plus grande énergie intrinsèque que les chaînes aliphatiques des résidus glucose de la cellulose. Ainsi, l'augmentation de la proportion de lignines chez les végétaux utilisés comme combustibles, selon le procédé susmentionné de l'invention, permet d'améliorer le potentiel énergétique de ces végétaux combustibles ainsi transformés.

15 La présente invention a également pour objet un procédé de modification de la composition, et donc des caractéristiques physicochimiques, des lignines produites par les plantes transformées, par rapport aux lignines normalement produites chez ces plantes, ledit procédé comprenant une étape de transformation de cellules de ces plantes à l'aide d'un vecteur contenant :

20 - une séquence nucléotidique codant pour un ARNm messager (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase, ou une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée d'une laccase, ou

30 - une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou complémentaire d'un fragment d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, ou complémentaire d'une séquence nucléotidique dérivée, soit d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, soit d'un fragment de cette dernière, cette séquence complémentaire codant pour une séquence nucléotidique antisens (encore désignée ARNm antisens) susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes,

35 ladite transformation étant effectuée notamment à l'aide d'un vecteur tel que décrit ci-dessus.

S'agissant des techniques de transformation utilisées pour la mise en oeuvre d'un des procédés décrits ci-dessus de l'invention, on aura avantageusement recours aux techniques suivantes:

5 A) La technologie de transformation par l'intermédiaire du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* décrite par Bevan (1984) Nucleic Acid Research, 12: 8711-8721. Elle fait appel essentiellement à la méthode de co-culture, et fait intervenir une co-transformation avec un gène de sélection pour pouvoir repérer les transformants.

10 Elle est particulièrement applicable aux dicotylédones, ex.: tabac, luzerne, colza.

B) La technique de transfert direct de gènes par biolistique décrite en détail par (Zumbrum et al., 1989, Technique 1, 204-216; Sanford et al., 1991, Technique 3, 3-16).

15 Cette technique implique l'association de l'ADN recombinant selon l'invention à des microparticules d'or ou de tungstène qui sont propulsées à l'aide d'un canon à particules sur le tissu à transformer. Elle sera particulièrement appliquée à la transformation d'espèces réfractaires aux agrobactéries.

20 Dans les deux cas susmentionnés, la vérification de la présence de l'ADN recombinant selon l'invention sera réalisée par des expériences d'hybridation de type Southern et d'amplification génique (polymerase chain reaction), à l'aide de sondes et d'amorces oligonucléotidiques issues notamment de la séquence SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5.

25 L'invention concerne également les cellules de plantes transformées par un vecteur selon l'invention, notamment par les techniques décrites ci-dessus, et comprenant une séquence d'ADN selon l'invention intégrée de façon stable dans leur génome.

L'invention vise également les plantes transformées telles qu'obtenues par culture des cellules transformées susmentionnées.

30 Les plantes transformées peuvent être ensuite propagées par voie sexuelle ou par voie végétative *in vitro* ou *in natura*.

35 L'invention a également pour objet les fragments de plantes, notamment fruits, semences, pollen, transformés par incorporation dans leur génome d'une séquence d'ADN selon l'invention, à l'aide des vecteurs recombinants susmentionnés.

L'invention concerne également les anticorps dirigés contre les polypeptides recombinants de l'invention, et plus particulièrement ceux dirigés contre les laccases recombinantes, ou fragments de laccases, susmentionnés.

De tels anticorps peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec ces polypeptides suivie de la récupération des anticorps formés.

Il va de soi que cette production n'est pas limitée aux anticorps polyclonaux.

5 Elle s'applique encore à tout anticorps monoclonal produit par tout hybridome susceptible d'être formé, par des méthodes classiques, à partir des cellules spléniques d'un animal, notamment de souris ou de rat, immunisés contre l'un des polypeptides purifiés de l'invention d'une part, et des cellules d'un myélome approprié d'autre part, et d'être sélectionné, par sa capacité à  
10 produire des anticorps monoclonaux reconnaissant le polypeptide susmentionné initialement mis en oeuvre pour l'immunisation des animaux.

L'invention vise également l'utilisation des anticorps susmentionnés dirigés contre les polypeptides recombinants de l'invention, pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection ou de dosage des laccases chez les plantes,  
15 à partir d'échantillons prélevés chez ces dernières.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du clonage de l'ADNc codant pour la laccase de tabac, et de la construction de plasmides contenant des séquences nucléotidiques de l'invention.

#### 20 1) Clonage de l'ADNc codant pour la laccase de tabac

Une banque d'ADNc provenant de tiges de tabac (*Nicotiana tabacum* cv Samsun), construite dans le site EcoRI du vecteur  $\lambda$  ZAPII (Stratagene, Cambridge, U.K.), a été criblée à l'aide d'une sonde hétérologue de laccase de sycamore. Cette sonde correspond à la séquence d'un ADNc de 435 paires de  
25 base (pb) publiée par Delaunay et al. (1994), codant pour une partie de la laccase susmentionnée et recouvrant l'extrémité 3' de la séquence d'ADNc (comprenant une zone codant pour une protéine avec deux régions conservées de fixation du cuivre) publiée par La Fayette et al. (1995).

Environ 400.000 plages de lyse ont été criblées et quatre clones positifs  
30 ont été détectés. Après excision du phage  $\lambda$  ZAPII dans le plasmide pBluescript (SK-) *in vivo*, ces clones ont été examinés.

La taille approximative de l'insert des quatre clones (pTL1-4) varie d'environ 700 pb à 2000 pb.

Une analyse préliminaire à l'aide d'enzymes de restriction de ces clones,  
35 a permis de montrer que deux d'entre eux (pTL1 et pTL3) contiennent le même insert (également confirmé par séquençage partiel de ces clones).

Les trois clones pTL2, pTL3 et pTL4 ont été davantage caractérisés par séquençage.



Parmi les trois clones analysés, celui possédant l'insert de plus grande taille, à savoir pTL3, contient un ADNc codant pour une laccase complète. L'insert PTL3 est long de 1984 pb (SEQ ID N0 1) et est constitué d'une région non traduite de 81 pb en 5', d'une phase de lecture ouverte codant pour une laccase de 1674 pb, et d'une région non codante de 229 pb en 3'.

Les deux autres ADNc des clones pTL2 et pTL4 sont longs de 1512 pb (SEQ ID N0 2) et 630 (SEQ ID N0 3) respectivement, et correspondent à des séquences partielles ne contenant pas la région codant pour la partie N-terminale de la laccase. Toutefois, les clones pTL2, -3 et -4 contiennent des séquences d'ADNc codant des laccases différentes, puisque leurs séquences sont différentes dans les régions se chevauchant. La séquence déduite en acides aminés de la séquence nucléotidique de l'insert de pTL3 est identique à 89 % aux séquences en acides aminés dérivées de pTL2 et pTL4 qui présentent 95 % d'identité entre elles. Les trois séquences d'ADNc ont également des régions non codantes en 3' différentes.

L'insert d'ADNc de pTL3 code pour un polypeptide de 557 acides aminés (61,9 kDa) avec un point isoélectrique (pI) de 10,08.

La protéine déduite possède douze sites de N-glycosylation possibles (Asn-Xaa-Ser/Thr). La région hydrophobe N-terminale de 22 acides aminés représente vraisemblablement le peptide signal, comme le laisse suggérer la comparaison avec la séquence de la laccase de sycomore. La scission de ce peptide signal doit avoir lieu entre les résidus Lys en position 22 et Arg en position 23 selon les règles de Von Heijne (Von Heijne, 1986). En conséquence, la protéine mature contient 535 acides aminés (59,4 kDa).

La comparaison de la séquence entière en acides aminés déduite de la séquence de pTL3 avec la séquence en acides aminés déduite de la laccase de sycomore (*Acer pseudoplatanus*) (La Fayette et al., 1995) indique que ces deux protéines ont 48 % d'identité, cette identité étant même supérieure (60 %) lorsque les 100 acides aminés C-terminaux sont considérés.

Cette région C-terminale contient deux sites potentiels de fixation du cuivre.

La séquence de la laccase de tabac a également été comparée avec d'autres oxydases à cuivre trouvées dans les banques de données. Parmi ces protéines, celles ayant présenté la plus grande homologie sont les ascorbate oxydases de concombre et de tabac avec 36 % et 34 % d'identité respectivement, par utilisation du programme BESTFIT (Genetics Computer Group, Wisconsin Package, Version 8).

Des comparaisons similaires ont été effectuées avec les laccases fongiques; 31 % et 28 % d'identité en acides aminés ont été trouvés avec les

séquences déduites respectivement de *Cryptococcus neoformans* et *Neurospora crassa*.

Dans chaque cas, des régions conservées dans la séquence peptidique de la laccase du tabac ont été identifiées, ces régions étant très similaires aux sites de fixation du cuivre conservées parmi les oxydases à cuivre (Ohkawa et al., 1989 ; Messerschmidt and Huber, 1990).

2) Construction de plasmides contenant des séquences nucléotidiques de l'invention

Le plasmide pBKTL8 (voir figure 1) a été conçu pour sur-exprimer un gène codant pour une laccase; il a été réalisé à partir de SEQ ID NO 1, à savoir à partir d'une séquence complète d'ADNc codant une laccase de tabac (séquence codante et extrémités 5' et 3' non codantes de l'ADNc).

Le plasmide pMBKTL (voir figure 2) correspond au plasmide pBKTL8 présenté dans la figure 1 dans lequel le site de restriction NcoI situé en amont de la séquence codant la laccase de tabac, a été éliminé.

Le plasmide pNKTL (voir figure 3) a été conçu pour sur-exprimer un gène codant pour une laccase; il a été réalisé à partir de la séquence d'ADNc codant une laccase de tabac délimitée par les nucléotides situés aux positions 82 et 1755 de SEQ ID NO 1 (clonage de la région codante uniquement).

Les plasmides pHS1 et pHS16 (voir figure 4) ont été conçus pour diminuer l'expression du (des) gène(s) codant pour la (les) laccase(s); ils ont été réalisés à partir d'une séquence partielle d'ADNc codant une laccase de tabac, à savoir la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 292 et 1766, qui a été clonée en orientation sens dans le cas du plasmide pHS16 et en orientation antisens dans le cas du plasmide pHS1.

Le plasmide pES22 (voir figure 5) a été conçu pour diminuer l'expression du (des) gène(s) codant pour la (les) laccase(s); il a été réalisé à partir de SEQ ID NO 1, à savoir à partir d'une séquence complète d'ADNc codant une laccase de tabac (séquence codante et extrémités 5' et 3' non codantes de l'ADNc) qui a été clonée en orientation antisens.

Le détail pour la construction de ces plasmides est indiqué dans les légendes des figures 1 à 5 qui suivent.

## LEGENDE DES FIGURES

- Figure 1: Préparation du plasmide pBKTL8

5 a) Représentation schématique du fragment d'ADNc contenu dans le plasmide pTL3

La séquence d'ADNc codant pour une laccase de tabac est indiquée en blanc. Les extrémités 5' et 3' non codantes de l'ADNc sont signalées en noir. L'insertion d'ADNc a été libérée par digestion par les enzymes de restriction SmaI et KpnI.

10 b) Représentation schématique de la cassette d'expression du vecteur de clonage pMJBx

CaMV 35S : séquences augmentant la transcription ("enhancer") et promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV);  $\Omega$  : élément oméga du virus de la mosaïque du tabac (TMV); nos3' : région de terminaison du gène codant la nopaline synthase; le site de multiclonage est signalé en noir.

c) Représentation schématique de la cassette d'expression contenue dans le plasmide pBK1

20 Le plasmide pBK1 a été obtenu par clonage du fragment d'ADNc SmaI-KpnI provenant de pTL3 (voir a) dans le plasmide pMJBx (voir b) digéré par les enzymes de restriction BamHI (digestion suivie d'un traitement par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I afin de générer une extrémité à bouts francs) et KpnI.

25 d) Représentation schématique des fragments de restriction issus du plasmide pBK1 et utilisés pour le clonage dans le vecteur binaire

- après digestion par les enzymes HindIII et XbaI (en haut)

- après digestion par l'enzyme XbaI (en bas)

e) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur binaire pBin19i

30 RB : région de bordure droite du T-DNA (right border); nos promoter : séquence promoteur du gène codant la nopaline synthase; nptII CDS : séquence codante du gène de résistance à la kanamycine; nos3' : séquence de terminaison du gène codant la nopaline synthase; LB : région de bordure gauche du T-DNA (left border); le site de multiclonage est signalé en noir.

35 f) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur de transformation pBKTL8

Le vecteur de transformation pBKTL8 a été obtenu par clonage de la cassette d'expression contenue dans le plasmide pBK1 (voir c) dans le vecteur binaire pBin19i (voir e). Ce clonage a été réalisé en deux étapes : le fragment

HindIII-XbaI issu de pBK1 (voir d) a tout d'abord été inséré dans le plasmide pBin19i digéré par les enzymes HindIII et XbaI puis le plasmide résultant a été ensuite linéarisé par digestion par l'enzyme XbaI afin de cloner dans un second temps le fragment XbaI-XbaI (voir d).

5

- Figure 2 : Préparation du plasmide pMBKTL

a) Représentation schématique de la cassette d'expression contenue dans le plasmide pBK1

10

Le plasmide pBK1 a été obtenu par clonage du fragment d'ADNc SmaI-KpnI provenant de pTL3 dans le plasmide pMJBx (voir figure 1c). Le site de restriction NcoI indésirable est signalé.

b) Représentation schématique de la cassette d'expression contenue dans le plasmide pMBK41

15

Le plasmide pMBK41 dérive du plasmide pBK1 qui a été modifié afin d'éliminer le site de restriction NcoI. Pour obtenir le plasmide pMBK41, le plasmide pBK1 a été linéarisé par digestion par l'enzyme NcoI puis le site de restriction NcoI a été détruit par une digestion par la nucléase Mung Bean et le plasmide a été refermé sur lui-même. La position du site NcoI éliminé est indiquée.

20

c) Représentation schématique de la cassette d'expression contenue dans le plasmide pBMK41

Le plasmide pMBK41 a été digéré par l'enzyme de restriction XhoI afin de libérer un fragment correspondant aux séquences oméga et de l'ADNc codant la laccase de tabac (voir d). Les sites XhoI sont signalés.

25

d) Représentation schématique du fragment de restriction généré par digestion du plasmide pMBK41 par l'enzyme XhoI et utilisé pour le clonage dans le vecteur binaire

e) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur de transformation pBKTL8

30

La construction du plasmide pBKTL8 a été décrite dans la figure 1. Les sites de restriction XhoI présents dans ce plasmide sont indiqués. Le site NcoI est également signalé. pBKTL8 a été digéré par l'enzyme XhoI afin d'éliminer une région correspondant aux séquences oméga et de l'ADNc de laccase de tabac pour la remplacer par la région équivalente mais ne contenant plus le site de restriction NcoI et provenant de pMBK41 (voir c et d). Le schéma suivant (f) présente le nouveau plasmide obtenu.

35

f) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur de transformation pMBKTL

Le vecteur de transformation pMBKTL a été obtenu par le remplacement d'un fragment de restriction XhoI-XhoI contenant une région correspondant aux séquences oméga et de l'ADNc codant la laccase de tabac du plasmide pBKTL8 (voir e) par un fragment équivalent provenant du plasmide pMBK41 (voir c et d). pMBKTL diffère de pBKTL8 uniquement par l'absence d'un site de restriction NcoI.

- Figure 3 : Préparation du plasmide pNKTL

a) Représentation schématique du fragment d'ADNc contenu dans le plasmide pTL3 et des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de la séquence codante

La séquence d'ADNc codant pour une laccase de tabac est indiquée en blanc. Les extrémités 5' et 3' non codantes de l'ADNc sont signalées en noir. La position des amorces utilisées pour amplifier par PCR la région correspondant à la séquence codant la laccase de tabac est indiquée. Ces amorces ont été définies de telle sorte qu'elles permettent d'introduire des sites de restriction NcoI (au niveau du codon ATG de début de traduction) et KpnI aux extrémités 5' et 3' respectivement, du produit d'amplification PCR.

b) Représentation schématique du produit d'amplification PCR obtenu à partir du plasmide pTL3

c) Représentation schématique de la cassette d'expression du vecteur de clonage pMJB1

CaMV 35S : séquences "enhancer" et promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV);  $\Omega$  : élément oméga du virus de la mosaïque du tabac (TMV); nos3' : région de terminaison du gène codant la nopaline synthase; le site de multiclonaage est signalé en noir.

d) Représentation schématique de la cassette d'expression contenue dans le plasmide pNK8

Le plasmide pNK8 provient du clonage du produit d'amplification PCR obtenu à partir de pTL3, digéré par les enzymes de restriction NcoI et KpnI (voir a et b) et inséré dans le plasmide pMJB1 (voir c) digéré par les mêmes enzymes.

La majeure partie des séquences provenant de l'amplification PCR a ensuite été éliminée du plasmide pNK8 afin d'éviter la présence d'éventuelles erreurs de séquence. Ceci a été réalisé par le remplacement de la région correspondant au fragment de restriction obtenu par digestion par les enzymes BsmI et XbaI par la région équivalente provenant du plasmide pTL3 d'origine (voir e).

e) Représentation schématique du fragment d'ADNc contenu dans le plasmide pTL3

La séquence d'ADNc codant pour une laccase de tabac est indiquée en blanc. Les extrémités 5' et 3' non codantes de l'ADNc sont signalées en noir. La position des sites de restriction BsmI et XbaI est indiquée.

f) Représentation schématique de la cassette d'expression contenue dans le plasmide pBX3

Le plasmide pBX3 a été obtenu à partir du plasmide pNK8 par le remplacement d'une région délimitée par les sites de restriction BsmI et XbaI par la région équivalente provenant du plasmide pTL3 d'origine. Les régions issues de l'amplification PCR sont indiquées en noir et ont été vérifiées par séquençage alors que les séquences provenant de l'ADNc d'origine sont représentées en blanc.

g) Représentation schématique de la cassette d'expression contenue dans le plasmide pBX3 et des fragments de restriction utilisés pour le clonage dans le vecteur binaire

Les régions issues de l'amplification PCR sont indiquées en noir alors que les séquences provenant de l'ADNc d'origine sont représentées en blanc.

Afin de cloner la cassette d'expression contenue dans le plasmide pBX3 dans le vecteur binaire pJR1Ri, pBX3 a été digéré par les enzymes de restriction HindIII et EcoRI générant deux fragments de restriction : HindIII-EcoRI et EcoRI-EcoRI qui ont été clonés en deux étapes dans le vecteur binaire.

h) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur binaire pJR1Ri

LB : région de bordure gauche du T-DNA (left border); nos3' : séquence de terminaison du gène codant la nopaline synthase; CaMV 35S : séquences "enhancer" et promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV); nptII CDS : séquence codante du gène de résistance à la kanamycine; nos promoter : séquence promoteur du gène codant la nopaline synthase; RB : région de bordure droite du T-DNA (right border).

i) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur de transformation pNKTL

Le vecteur de transformation pNKTL a été obtenu par clonage de la cassette d'expression contenue dans le plasmide pBX3 (voir g) dans le vecteur binaire pJR1Ri (voir h). Ce clonage a été réalisé en deux étapes : le fragment HindIII-EcoRI issu de pBX3 (voir g) a tout d'abord été inséré dans le plasmide pJR1Ri digéré par les enzymes HindIII et EcoRI puis le plasmide résultant a

été ensuite linéarisé par digestion par l'enzyme EcoRI afin de cloner dans un second temps le fragment EcoRI-EcoRI (voir g).

- Figure 4 : Préparation des plasmides pHS1 et pHS16

5 a) Représentation schématique du fragment d'ADNc contenu dans le plasmide pTL3

La séquence d'ADNc codant pour une laccase de tabac est indiquée en blanc. Les extrémités 5' et 3' non codantes de l'ADNc sont signalées en noir. Un fragment d'ADNc correspondant à une séquence partielle d'ADNc codant pour une laccase de tabac a été obtenu par digestion du plasmide pTL3 par les enzymes de restriction HindII et StuI. La position de ces sites de restriction est indiquée.

10 b) Représentation schématique du fragment de restriction généré par digestion du plasmide pTL3 par les enzymes HindII et StuI et utilisé pour le clonage dans le vecteur binaire

15 c) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur binaire pJR1Ri

RB : région de bordure droite du T-DNA (right border); nos promoteur : séquence promoteur du gène codant la nopaline synthase; nptII CDS : séquence codante du gène de résistance à la kanamycine; nos3' : séquence de terminaison du gène codant la nopaline synthase; CaMV 35S : séquences "enhancer" et promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV); LB : région de bordure gauche du T-DNA (left border); le site de multiclonage est signalé en noir.

25 d) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur de transformation pHS16

Le vecteur de transformation pHS16 a été obtenu par clonage du fragment d'ADNc HindII-StuI provenant de pTL3 (voir a et b) dans le vecteur binaire pJR1Ri (voir c) linéarisé par digestion par l'enzyme de restriction SmaI. La séquence d'ADNc est insérée en orientation sens.

30 e) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur de transformation pHS1

Le vecteur de transformation pHS1 a été obtenu par clonage du fragment d'ADNc HindII-StuI provenant de pTL3 (voir a et b) dans le vecteur binaire pJR1Ri (voir c) linéarisé par digestion par l'enzyme de restriction SmaI. La séquence d'ADNc est insérée en orientation antisens.

- Figure 5 : Préparation du plasmide pES22

a) Représentation schématique du fragment d'ADNc contenu dans le plasmide pTL3

La séquence d'ADNc codant pour une laccase de tabac est indiquée en blanc. Les extrémités 5' et 3' non codantes de l'ADNc sont signalées en noir. L'insertion d'ADNc a été libérée par digestion par les enzymes de restriction SmaI et EcoRV.

b) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur binaire pJR1Ri

RB : région de bordure droite du T-DNA (right border); nos promoter : séquence promoteur du gène codant la nopaline synthase; nptII CDS : séquence codante du gène de résistance à la kanamycine; nos3' : séquence de terminaison du gène codant la nopaline synthase; CaMV 35S : séquences "enhancer" et promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV); LB : région de bordure gauche du T-DNA (left border); le site de multiclونage est signalé en noir.

c) Représentation schématique de la région T-DNA du vecteur de transformation pES22

Le vecteur de transformation pES22 a été obtenu par clonage du fragment d'ADNc SmaI-EcoRV provenant de pTL3 (voir a) dans le vecteur binaire pJR1Ri (voir b) linéarisé par digestion par l'enzyme de restriction SmaI. La séquence d'ADNc est insérée en orientation antisens.



## BIBLIOGRAPHIE

- 5       - Boudet et *al.*, Plant J., 8 (1995), 465-477 ;
- Dean and Erikson, Holzforschung 48 (1994) Suppl. 21-33 ;
- Delaunay et *al.*, Molecular characterization of sycomore laccase. 4th  
10      International Congress of Plant Molecular Biology, Amsterdam, The  
      Netherlands, June 19-24, 1994 ;
- Driouich et *al.*, Plant J., 2 (1992), 13-24 ;
- 15      - La Fayette et *al.*, Plant Physiol., 107 (1995), 667-668 ;
- Messerschmidt and Huber, Eur. J. Biochem., 187 (1990), 341-352 ;
- Ohkawa et *al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (1989), 1239-1243 ;
- 20      - O'Malley et *al.*, Plant J. 4 (1993), 751-757 ;
- Ryden and Hunt, J. Mol. Evol., 36 (1993), 41-66 ;
- 25      - Van Heijne, Nucleic Acides Res., 14 (1986), 4683-4690.

32  
LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
(B) RUE: 3, rue Michel-Ange  
(C) VILLE: PARIS  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 75016 PARIS

(ii) TITRE DE L' INVENTION: SEQUENCES D'ADN CODANT POUR DES LACCASES,  
ET LEURS APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE LA REGULATION DES  
TENEURS EN LIGNINES DES PLANTES.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1984 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

## (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMBLEMENT: 82..1752

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CAGAAAATCA TTTCAATTCG TTCTCTATAG CACAATTGTA AATAGAAGTC CAATTGCAGA 60

AATTTCAAGA AAGAGACAAA A ATG AAC TCT TGG ATT CGT CTT TTC ATA GTA 111  
Met Asn Ser Trp Ile Arg Leu Phe Ile Val  
1 5 10

TTG GCA GCT TGT CTT TTT CCT CTT GTC GTT GAA TGC AGG ATT CGA CAT 159  
Leu Ala Ala Cys Leu Phe Pro Leu Val Val Glu Cys Arg Ile Arg His  
15 20 25

TAC AAG TTC AAT GTG GTA ATG AAG AAC ACG ACT CGC CTT TGT TCA TCC 207  
Tyr Lys Phe Asn Val Val Met Lys Asn Thr Thr Arg Leu Cys Ser Ser  
30 35 40

BNSDOCID: <WO 9745549A1 I >

									34										
	AAT	GTA	ATT	GTC	ACT	GCC	AAT	CAA	GGT	TCT	GGA	AAA	TAC	ATG	GTT	GCT		927	
	Asn	Val	Ile	Val	Thr	Ala	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Lys	Tyr	Met	Val	Ala			
				270					275						280				
5	GCT	TCA	CCT	TTT	ATG	GAT	GCA	CCA	ATT	GCT	GTT	GAT	AAT	GTT	ACA	GCA		975	
	Ala	Ser	Pro	Phe	Met	Asp	Ala	Pro	Ile	Ala	Val	Asp	Asn	Val	Thr	Ala			
			285					290					295						
10	ATA	GCC	ACT	TTA	CAT	TAT	TCT	GGC	ACA	CAA	GGA	AAT	AGC	CAC	ATT	TCA		1023	
	Ile	Ala	Thr	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Asn	Ser	His	Ile	Ser			
		300					305					310							
15	CTT	ACT	AGT	ACA	CCA	CCT	AAA	AAT	GCC	ACC	CCT	GTA	GCC	AAC	ACT	TTT		1071	
	Leu	Thr	Ser	Thr	Pro	Pro	Lys	Asn	Ala	Thr	Pro	Val	Ala	Asn	Thr	Phe			
	315					320					325				330				
20	CTT	GAT	TCT	TTA	AGA	AGC	CTG	AAT	TCC	AAA	AAA	TAC	CCT	GCT	AAA	GTT		1119	
	Leu	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Leu	Asn	Ser	Lys	Lys	Tyr	Pro	Ala	Lys	Val			
				335						340					345				
	CCC	AAA	AAA	ATT	GAT	CAT	TCC	CTA	TTT	TTC	ACG	GTA	GGT	TTA	GGG	ATT		1167	
	Pro	Lys	Lys	Ile	Asp	His	Ser	Leu	Phe	Phe	Thr	Val	Gly	Leu	Gly	Ile			
				350					355					360					
25	AAT	CCA	TGC	CCA	ACT	TGC	AAA	CAA	GGT	AAT	GGA	AGC	AGA	GTT	GTG	GCT		1215	
	Asn	Pro	Cys	Pro	Thr	Cys	Lys	Gln	Gly	Asn	Gly	Ser	Arg	Val	Val	Ala			
			365					370					375						
30	AGT	GTA	AAC	AAT	GTT	ACA	TTC	GTT	ATG	CCA	ACG	GTT	GCC	CTT	TTA	CAA		1263	
	Ser	Val	Asn	Asn	Val	Thr	Phe	Val	Met	Pro	Thr	Val	Ala	Leu	Leu	Gln			
		380					385					390							
35	GCA	CAT	TTC	TTT	GGG	ACT	AAA	GGA	GTT	TTC	ACG	ACA	GAT	TTT	CCA	GCA		1311	
	Ala	His	Phe	Phe	Gly	Thr	Lys	Gly	Val	Phe	Thr	Thr	Asp	Phe	Pro	Ala			
	395					400					405					410			
40	AAC	CCG	CCT	TTT	GCT	TTC	AAC	TAT	ACG	GGA	ACA	GGA	CCA	ACT	AAT	TTG		1359	
	Asn	Pro	Pro	Phe	Ala	Phe	Asn	Tyr	Thr	Gly	Thr	Gly	Pro	Thr	Asn	Leu			
				415						420					425				
	GCG	ACG	ATG	AAT	GGG	ACT	AAG	GTT	TAT	AGG	CTG	CGG	TAT	AAC	GAT	ACA		1407	
	Ala	Thr	Met	Asn	Gly	Thr	Lys	Val	Tyr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Asn	Asp	Thr			
				430					435						440				
45	GTT	CAA	TTG	GTT	TTG	CAG	GAT	ACT	GGA	ATT	ATA	GCC	CCT	GAG	AAC	CAT		1455	
	Val	Gln	Leu	Val	Leu	Gln	Asp	Thr	Gly	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Asn	His			
			445					450					455						
50	CCA	ATC	CAT	TTG	CAT	GGC	TTC	AAT	TTT	TTT	CTA	GTG	GGT	AAA	GGC	ATA		1503	
	Pro	Ile	His	Leu	His	Gly	Phe	Asn	Phe	Phe	Leu	Val	Gly	Lys	Gly	Ile			
		460					465					470							
55	GGA	AAT	TTT	AAT	CCA	AAA	ACA	GAT	CCT	AAG	AAT	TTT	AAT	CTT	GTG	GAT		1551	
	Gly	Asn	Phe	Asn	Pro	Lys	Thr	Asp	Pro	Lys	Asn	Phe	Asn	Leu	Val	Asp			
	475					480					485				490				

55

36

Tyr Ile Thr Gln Cys Pro Ile Gln Pro Gly Gln Asn Tyr Val Tyr Asn  
100 105 110

5 Phe Thr Ile Thr Gly Gln Arg Gly Thr Leu Phe Trp His Ala His Ile  
115 120 125

Leu Trp Leu Arg Ala Thr Val His Gly Ala Ile Val Ile Leu Pro Asn  
130 135 140

10 Leu Gly Val Pro Tyr Pro Phe Pro Lys Pro Asn His Glu Ala Val Val  
145 150 155 160

Ile Leu Ala Glu Trp Trp Lys Ser Asp Thr Glu Ala Val Ile Asn Glu  
165 170 175

15 Ala Ile Lys Ser Gly Leu Ala Pro Asn Val Ser Asp Ala His Thr Ile  
180 185 190

20 Asn Gly His Pro Gly Pro Val Ser Asn Cys Ala Ser Gln Gly Gly Tyr  
195 200 205

Lys Leu Asn Val Asp Pro Gly Lys Thr Tyr Met Leu Arg Val Ile Asn  
210 215 220

25 Ala Ala Leu Asn Glu Glu Leu Phe Phe Lys Ile Ala Gly His Lys Met  
225 230 235 240

Thr Val Val Glu Val Asp Ala Thr Tyr Ile Lys Pro Phe Lys Thr Asp  
245 250 255

30 Thr Ile Val Ile Ala Pro Gly Gln Thr Thr Asn Val Ile Val Thr Ala  
260 265 270

35 Asn Gln Gly Ser Gly Lys Tyr Met Val Ala Ala Ser Pro Phe Met Asp  
275 280 285

Ala Pro Ile Ala Val Asp Asn Val Thr Ala Ile Ala Thr Leu His Tyr  
290 295 300

40 Ser Gly Thr Gln Gly Asn Ser His Ile Ser Leu Thr Ser Thr Pro Pro  
305 310 315 320

Lys Asn Ala Thr Pro Val Ala Asn Thr Phe Leu Asp Ser Leu Arg Ser  
325 330 335

45 Leu Asn Ser Lys Lys Tyr Pro Ala Lys Val Pro Lys Lys Ile Asp His  
340 345 350

Ser Leu Phe Phe Thr Val Gly Leu Gly Ile Asn Pro Cys Pro Thr Cys  
355 360 365

50 Lys Gln Gly Asn Gly Ser Arg Val Val Ala Ser Val Asn Asn Val Thr  
370 375 380

55 Phe Val Met Pro Thr Val Ala Leu Leu Gln Ala His Phe Phe Gly Thr  
385 390 395 400

	Lys	Gly	Val	Phe	Thr	Thr	Asp	Phe	Pro	Ala	Asn	Pro	Pro	Phe	Ala	Phe	
					405					410					415		
5	Asn	Tyr	Thr	Gly	Thr	Gly	Pro	Thr	Asn	Leu	Ala	Thr	Met	Asn	Gly	Thr	
				420					425					430			
	Lys	Val	Tyr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Asn	Asp	Thr	Val	Gln	Leu	Val	Leu	Gln	
			435					440					445				
10	Asp	Thr	Gly	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Asn	His	Pro	Ile	His	Leu	His	Gly	
			450				455					460					
	Phe	Asn	Phe	Phe	Leu	Val	Gly	Lys	Gly	Ile	Gly	Asn	Phe	Asn	Pro	Lys	
	465					470					475					480	
15	Thr	Asp	Pro	Lys	Asn	Phe	Asn	Leu	Val	Asp	Pro	Val	Glu	Arg	Asn	Thr	
				485						490					495		
20	Val	Gly	Val	Pro	Ala	Gly	Gly	Trp	Val	Ala	Ile	Arg	Phe	Arg	Ala	Asp	
				500					505					510			
	Asn	Pro	Gly	Val	Trp	Phe	Met	His	Cys	His	Leu	Glu	Ile	His	Thr	Thr	
			515					520					525				
25	Trp	Gly	Leu	Lys	Met	Ala	Trp	Leu	Val	Asp	Asn	Gly	Lys	Gly	Pro	Asn	
		530					535					540					
	Glu	Ser	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Lys	Asp	Leu	Pro	Lys	Cys				
	545					550					555						
30	(2)	INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:															
	(i)	CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:															
		(A) LONGUEUR: 1512 paires de bases															
35		(B) TYPE: acide nucléique															
		(C) NOMBRE DE BRINS: simple															
		(D) CONFIGURATION: linéaire															
	(ii)	TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm															
40																	
	(ix)	CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:															
		(A) NOM/CLE: CDS															
45		(B) EMLACEMENT: 1..1227															
	(xi)	DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:															
	CAT	CCA	TTC	CCC	AAA	CCC	AAC	CAT	GAA	GCT	GTC	GTT	GTT	TTA	GCT	GAA	
50	His	Pro	Phe	Pro	Lys	Pro	Asn	His	Glu	Ala	Val	Val	Val	Leu	Ala	Glu	48
	1				5					10					15		
	TGG	TGG	AAA	TCG	GAT	ACT	GAA	GCT	GTG	ATT	AAT	GAA	GCT	CTA	AAA	TCA	
	Trp	Trp	Lys	Ser	Asp	Thr	Glu	Ala	Val	Ile	Asn	Glu	Ala	Leu	Lys	Ser	96
				20					25					30			
55	GGT	TTA	GCC	CCC	AAT	GTT	TCC	GAT	GCT	CAC	ACA	ATC	AAT	GGT	CAT	CCT	
	Gly	Leu	Ala	Pro	Asn	Val	Ser	Asp	Ala	His	Thr	Ile	Asn	Gly	His	Pro	144
			35						40					45			

	GGA CCA GTT TCC AAT TGT CCG ACC CAA GGT GGA TAC AGC TTG AGT GTT	192
	Gly Pro Val Ser Asn Cys Pro Thr Gln Gly Gly Tyr Ser Leu Ser Val	
	50 55 60	
5	GAA CCT GGA AAA ACA TAC ATG TTA CGA GTG ATC AAT GCT GCG CTC AAT	240
	Glu Pro Gly Lys Thr Tyr Met Leu Arg Val Ile Asn Ala Ala Leu Asn	
	65 70 75 80	
10	GAA GAA CTC TTC TTT AAG ATT GCT GGC CAC AAA ATG ACT GTA GTT GAA	288
	Glu Glu Leu Phe Phe Lys Ile Ala Gly His Lys Met Thr Val Val Glu	
	85 90 95	
15	GTG GAT GCC ACT TAC GTA AAA CCC TTC AAA ACA GAC ACA ATT GTA ATC	336
	Val Asp Ala Thr Tyr Val Lys Pro Phe Lys Thr Asp Thr Ile Val Ile	
	100 105 110	
20	GCC CCT GGC CAA ACA ACA AAT GTT ATA GTA ACT GCT GAT CAG AGT TTC	384
	Ala Pro Gly Gln Thr Thr Asn Val Ile Val Thr Ala Asp Gln Ser Phe	
	115 120 125	
25	GGA AAA TAT ATG GTT GCT GCT TCT CCC TTT ATG GAC GCT CCT ATC GCC	432
	Gly Lys Tyr Met Val Ala Ala Ser Pro Phe Met Asp Ala Pro Ile Ala	
	130 135 140	
30	GTC GAC AAT ATC ACG GCC ACC GCC ACG TTG CAT TAT TCC GGC GCA CTA	480
	Val Asp Asn Ile Thr Ala Thr Ala Thr Leu His Tyr Ser Gly Ala Leu	
	145 150 155 160	
35	GGC ACT TCT CCC ACA ACT CTC ACT AGT ACT CCG CCC CAA AAC GCC ACT	528
	Gly Thr Ser Pro Thr Thr Leu Thr Ser Thr Pro Pro Gln Asn Ala Thr	
	165 170 175	
40	TCA GTA GCC AAC AAT TTT CTT GAC GCT CTC AAA AGT CTT AAT TCA AAA	576
	Ser Val Ala Asn Asn Phe Leu Asp Ala Leu Lys Ser Leu Asn Ser Lys	
	180 185 190	
45	AAA TAC CCA GCT AAA GTT CCA CAA ACT GTG GAT CAT TCG TTG TTT TTC	624
	Lys Tyr Pro Ala Lys Val Pro Gln Thr Val Asp His Ser Leu Phe Phe	
	195 200 205	
50	ACT GCT GGA CTT GGA ATT AAT CCA TGT CCA ACG TGT AAA CAA GCT AAT	672
	Thr Ala Gly Leu Gly Ile Asn Pro Cys Pro Thr Cys Lys Gln Ala Asn	
	210 215 220	
55	GGC AGC AGA GTT GTC GCT AGT GTA AAT AAT GTT ACA TTT GTT ATG CCA	720
	Gly Ser Arg Val Val Ala Ser Val Asn Asn Val Thr Phe Val Met Pro	
	225 230 235 240	
60	ACC GTA GCG CTT TTA CAA GCG CAT TTC TTT GGC ATA AAT GGT GTT TTC	768
	Thr Val Ala Leu Leu Gln Ala His Phe Phe Gly Ile Asn Gly Val Phe	
	245 250 255	
65	ACA ACA GAT TTT CCA GCG AAT CCG CCA TTC GTT TTT AAC TAT ACT GGA	816
	Thr Thr Asp Phe Pro Ala Asn Pro Pro Phe Val Phe Asn Tyr Thr Gly	
	260 265 270	



[illegible]

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

50

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 409 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

His Pro Phe Pro Lys Pro Asn His Glu Ala Val Val Val Leu Ala Glu  
 1 5 10 15  
 5 Trp Trp Lys Ser Asp Thr Glu Ala Val Ile Asn Glu Ala Leu Lys Ser  
 20 25 30  
 Gly Leu Ala Pro Asn Val Ser Asp Ala His Thr Ile Asn Gly His Pro  
 35 40 45  
 10 Gly Pro Val Ser Asn Cys Pro Thr Gln Gly Gly Tyr Ser Leu Ser Val  
 50 55 60  
 15 Glu Pro Gly Lys Thr Tyr Met Leu Arg Val Ile Asn Ala Ala Leu Asn  
 65 70 75 80  
 Glu Glu Leu Phe Phe Lys Ile Ala Gly His Lys Met Thr Val Val Glu  
 85 90 95  
 20 Val Asp Ala Thr Tyr Val Lys Pro Phe Lys Thr Asp Thr Ile Val Ile  
 100 105 110  
 Ala Pro Gly Gln Thr Thr Asn Val Ile Val Thr Ala Asp Gln Ser Phe  
 115 120 125  
 25 Gly Lys Tyr Met Val Ala Ala Ser Pro Phe Met Asp Ala Pro Ile Ala  
 130 135 140  
 Val Asp Asn Ile Thr Ala Thr Ala Thr Leu His Tyr Ser Gly Ala Leu  
 145 150 155 160  
 30 Gly Thr Ser Pro Thr Thr Leu Thr Ser Thr Pro Pro Gln Asn Ala Thr  
 165 170 175  
 35 Ser Val Ala Asn Asn Phe Leu Asp Ala Leu Lys Ser Leu Asn Ser Lys  
 180 185 190  
 Lys Tyr Pro Ala Lys Val Pro Gln Thr Val Asp His Ser Leu Phe Phe  
 195 200 205  
 40 Thr Ala Gly Leu Gly Ile Asn Pro Cys Pro Thr Cys Lys Gln Ala Asn  
 210 215 220  
 Gly Ser Arg Val Val Ala Ser Val Asn Asn Val Thr Phe Val Met Pro  
 225 230 235 240  
 Thr Val Ala Leu Leu Gln Ala His Phe Phe Gly Ile Asn Gly Val Phe  
 245 250 255  
 50 Thr Thr Asp Phe Pro Ala Asn Pro Pro Phe Val Phe Asn Tyr Thr Gly  
 260 265 270  
 Thr Pro Pro Thr Asn Leu Ala Thr Thr Asn Gly Thr Lys Val Tyr Arg  
 275 280 285  
 55 Leu Pro Tyr Asn Ala Thr Val Gln Leu Val Leu Gln Asp Thr Gly Ile  
 290 295 300

41

Ile Ala Pro Glu Asn His Pro Ile His Leu His Gly Phe Asn Phe Phe  
 305 310 315 320

5 Leu Val Gly Lys Gly Leu Gly Asn Phe Asn Ser Lys Thr Asp Pro Lys  
 325 330 335

Asn Phe Asn Leu Ile Asp Pro Val Glu Arg Asn Thr Ile Gly Val Pro  
 340 345 350

10 Ser Gly Gly Trp Val Ala Ile Arg Trp Leu Ala Asp Asn Pro Gly Val  
 355 360 365

Trp Phe Met His Cys His Leu Glu Val His Thr Thr Trp Gly Leu Lys  
 370 375 380

15 Met Ala Phe Leu Val Asp Asn Gly Lys Gly Pro Lys Glu Ser Leu Leu  
 385 390 395 400

Pro Pro Pro Lys Asp Leu Pro Lys Cys  
 405

20

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 25 (A) LONGUEUR: 630 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

## (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- 35 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMPLACEMENT: 1..273

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

40 CTT TTT TTA GTG GGT AAA GGA CTA GGA AAT TTC AAT TCC AAA ACA GAC 48  
 Leu Phe Leu Val Gly Lys Gly Leu Gly Asn Phe Asn Ser Lys Thr Asp  
 1 5 10 15

CCT AAG AAT TTT AAT CTT ATT GAT CCT GTT GAA AGG AAT ACA ATT GGA 96  
 45 Pro Lys Asn Phe Asn Leu Ile Asp Pro Val Glu Arg Asn Thr Ile Gly  
 20 25 30

GTG CCT TCT GGA GGA TGG GTT GCC ATA AGA TGG CGT GCT GAC AAT CCA 144  
 Val Pro Ser Gly Gly Trp Val Ala Ile Arg Trp Arg Ala Asp Asn Pro  
 50 35 40 45

GGA GTT TGG TTT ATG CAT TGT CAT CTA GAG GTG CAC ACA ACA TGG GGA 192  
 Gly Val Trp Phe Met His Cys His Leu Glu Val His Thr Thr Trp Gly  
 50 55 60

55 TTG AAA ATG GCA TTC CTT GTA GAT AAT GGC AAG GGT TCT AAT GAG TCA 240  
 Leu Lys Met Ala Phe Leu Val Asp Asn Gly Lys Gly Ser Asn Glu Ser  
 65 70 75 80

CTT TTG CCA CCA CCA AAG GAT CTC CCA AAA TGC TAAAATAATG ATGGAAATCC 293  
 Leu Leu Pro Pro Pro Lys Asp Leu Pro Lys Cys  
                     85                    90

5 ATTTGTTTCT CCTCTCAACA AGTTCAGACA AATCTTAATT TGCAACAAAA GCTGCACCAA 353  
 GCAATGAGAG AAGAATTAGA GTCAATAAGC AATGTACTAT TCATTTTCTT GAGTGAAAAA 413  
 10 GACTAGGAGA ATTTTGCTCA AGCAATATTC AATAATTATG TTTGTATGCA TATATACATT 473  
 TTTTTTTGTC CTTGTTCAAG GAAGTTTGAG AGATGGATTG TACGTTTCTT TTACCTCTTA 533  
 TTATTGTCAC TCCCAAGTCA TACTTTCTGT TAAAAGTTTT CTGAATGTTT TAAATTTAGA 593  
 15 AATAACATTA CAGTAACAGA AAAAAAAAAA AAAAAAG 630

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 91 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

30 Leu Phe Leu Val Gly Lys Gly Leu Gly Asn Phe Asn Ser Lys Thr Asp  
       1                    5                    10                    15  
 Pro Lys Asn Phe Asn Leu Ile Asp Pro Val Glu Arg Asn Thr Ile Gly  
                     20                    25                    30  
 35 Val Pro Ser Gly Gly Trp Val Ala Ile Arg Trp Arg Ala Asp Asn Pro  
                     35                    40                    45  
 Gly Val Trp Phe Met His Cys His Leu Glu Val His Thr Thr Trp Gly  
 40                    50                    55                    60  
 Leu Lys Met Ala Phe Leu Val Asp Asn Gly Lys Gly Ser Asn Glu Ser  
       65                    70                    75                    80  
 45 Leu Leu Pro Pro Pro Lys Asp Leu Pro Lys Cys  
                     85                    90

50

## REVENDICATIONS

1. Utilisation de séquences nucléotidiques recombinantes contenant une (ou plusieurs) région(s) codante(s), cette (ces) région(s) codante(s) étant constituée(s) :

- d'une séquence nucléotidique codant pour un ARN messenger (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou d'un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase, ou d'une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée d'une laccase, ou

- d'une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou complémentaire d'un fragment d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, ou complémentaire d'une séquence nucléotidique dérivée, soit d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, soit d'un fragment de cette dernière, cette séquence complémentaire codant pour une séquence nucléotidique antisens (encore désignée ARNm antisens) susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, pour la transformation de cellules végétales en vue de l'obtention de plantes transgéniques au sein desquelles la biosynthèse des lignines est régulée soit dans le sens d'une augmentation, soit dans le sens d'une diminution des teneurs en lignines produites, par rapport aux teneurs normales en lignines produites chez les plantes non transformées, et/ou dans le sens d'une modification de la composition des lignines produites par lesdites plantes transgéniques par rapport aux lignines produites chez les plantes non transformées.

2. Utilisation de séquences nucléotidiques recombinantes selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elles contiennent tout ou partie d'une séquence nucléotidique choisie parmi les suivantes:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la laccase de tabac représentée par SEQ ID NO 2,

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 3, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase de tabac, ce fragment étant représenté par SEQ ID NO 4,

5 - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase de tabac, ce fragment étant représenté par SEQ ID NO 6,

10 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, et plus particulièrement avec l'ARNm codé par les séquences SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, et SEQ ID NO 5 respectivement,

15 - la séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant soit pour un ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou pour les fragments de laccase représentés par SEQ ID NO 4, ou SEQ ID NO 6, soit pour une protéine dérivée de la laccase ou fragments de laccase susmentionnés,

20 - la séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique complémentaire susmentionnée, par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, et plus particulièrement avec un des ARNm susmentionnés.

25

3. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend l'une au moins des séquences suivantes :

30 - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 1, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou

- un fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un fragment de la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou

35 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 1 susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou pour une protéine dérivée de cette dernière,

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 3, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase de tabac, ce fragment étant représenté par SEQ ID NO 4, ou

5       - un fragment de la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 3, ce fragment codant pour un fragment de la laccase représentée par SEQ ID NO 4, ou

10       - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 3, susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour le fragment de laccase représenté par SEQ ID NO 4, ou pour une protéine dérivée de ce dernier,

15       - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5, codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase de tabac, ce fragment étant représenté par SEQ ID NO 6, ou

      - un fragment de la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO 5, ce fragment codant pour un fragment de la laccase représentée par SEQ ID NO 6, ou

20       - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence représentée par SEQ ID NO 5, susmentionnée, ou d'un fragment tel que décrit ci-dessus de cette séquence, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm codant lui-même pour le fragment de laccase représenté par SEQ ID NO 6, ou pour une protéine dérivée de ce dernier.

25

4. Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend l'une au moins des séquences suivantes :

30       - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 1, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, à savoir avec l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 1, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

35       - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-

même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, tel que défini ci-dessus,  
ou

5 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné,

10 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 3, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 4, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 3, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

15 - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 4, telle que définie ci-dessus, ou

20 - toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné,

25 - la séquence nucléotidique complémentaire de celle représentée par SEQ ID NO 5, cette séquence complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 6, à savoir l'ARNm codé par la séquence représentée par SEQ ID NO 5, ou codé par une séquence dérivée de cette dernière, telle que définie ci-dessus, ou

30 - un fragment de la séquence complémentaire susmentionnée, ce fragment de séquence codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes, notamment chez le tabac, et plus particulièrement avec l'ARNm codant lui-même pour la laccase représentée par SEQ ID NO 6, telle que définie ci-dessus, ou

35



- toute séquence nucléotidique dérivée de la séquence complémentaire susmentionnée, ou du fragment de cette séquence complémentaire tel que décrit ci-dessus, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette séquence dérivée codant  
5 pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm susmentionné.

5. ARNm codé par une séquence d'ADN selon la revendication 3, et plus particulièrement :

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 1,  
10 ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour la laccase présente chez le tabac, telle que représentée par SEQ ID NO 2, ou pour un fragment de cette laccase ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus,

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 3,  
15 ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour le fragment d'une laccase présente chez le tabac, telle que représentée par SEQ ID NO 4, ou pour un fragment de ce dernier ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus,

- l'ARNm codé par la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO 5,  
20 ou codé par un fragment ou une séquence dérivée tels que définis ci-dessus, ledit ARNm étant susceptible de coder à son tour pour le fragment d'une laccase présente chez le tabac, telle que représentée par SEQ ID NO 6, ou pour un fragment de ce dernier ou une protéine dérivée tels que définis ci-dessus.  
25

6. ARNm antisens, caractérisé en ce qu'il comprend des nucléotides complémentaires de la totalité ou d'une partie seulement des nucléotides constituant un ARNm selon la revendication 5, et en ce qu'il est susceptible de  
30 s'hybrider avec ce dernier.

7. Laccases de tabac telles qu'obtenues sous forme essentiellement pure par extraction et purification à partir de tabac, et plus particulièrement la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou celle comprenant le polypeptide représenté par SEQ ID NO 4, ou encore celle comprenant le polypeptide  
35 représenté par SEQ ID NO 6, ou toute protéine dérivée de ces dernières, notamment par addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou tout fragment issu desdites laccases ou de leurs séquences dérivées.

8. Séquences nucléotidiques codant pour la laccase représentée par SEQ ID NO 2, ou pour les polypeptides représentés par SEQ ID NO 4, et SEQ ID NO 6, ou toute séquence dérivée ou fragment de ces derniers, tels que définis dans la revendication 7, lesdites séquences nucléotidiques étant caractérisées en ce qu'elles correspondent à tout ou partie des séquences représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, ou SEQ ID NO 5, respectivement, ou à toute séquence dérivée de ces dernières par dégénérescence du code génétique, et étant néanmoins susceptibles de coder pour les laccases ou séquence dérivée ou fragment de ces dernières, tels que définis ci-dessus.

9. Complexes formés entre un ARNm antisens selon la revendication 6, et un ARNm selon la revendication 5.

10. Séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'ADN selon la revendication 3, susceptible de coder pour un ARNm lui-même susceptible de coder pour une laccase ou toute séquence dérivée ou fragment de cette dernière, ladite séquence selon la revendication 3 étant insérée dans une séquence hétérologue.

11. Séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'ADN complémentaire selon la revendication 4, insérée dans une séquence hétérologue, ladite séquence d'ADN complémentaire codant pour un ARNm antisens susceptible de s'hybrider avec l'ARNm codant pour une laccase ou toute séquence dérivée ou fragment de cette dernière.

12. Séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 10 ou la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend les éléments nécessaires pour réguler l'expression de la séquence nucléotidique selon la revendication 3, ou de sa séquence complémentaire selon la revendication 4, notamment un promoteur et un terminateur de la transcription de ces séquences, et le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une autre enzyme que la laccase, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment l'ARNm codant pour l'alcool cinnamylique deshydrogénase (CAD), et/ou l'ARNm codant pour la cinnamoyl CoA réductase (CCR), et/ou l'ARNm codant pour l'O-méthyltransférase (OMT), ou comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour tout ou partie d'un ARNm antisens susceptible de

s'hybrider avec l'ARNm susmentionné, notamment avec l'ARNm codant pour la CAD, la CCR ou l'OMT.

13. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend une séquence  
5 nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 10 à 12, intégrée dans l'un de ses sites de son génome non essentiels pour sa réplication.

14. Procédé de régulation de la biosynthèse des lignines chez les plantes, soit par diminution, soit par augmentation des quantités de lignines produites,  
10 par rapport aux quantités normales de lignines produites chez ces plantes, ledit procédé comprenant une étape de transformation de cellules de ces plantes à l'aide d'un vecteur contenant:

- une séquence nucléotidique codant pour un ARN messager (ARNm), cet ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou un fragment  
15 de la séquence nucléotidique susmentionnée, ce fragment codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour un fragment d'une laccase, ou une séquence nucléotidique dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou dérivée du fragment susmentionné, notamment par mutation et/ou addition, et/ou suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, cette  
20 séquence dérivée codant pour un ARNm, cet ARNm codant lui-même pour une protéine dérivée d'une laccase, ou

- une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique codant pour un ARNm codant lui-même pour une laccase chez les plantes, ou complémentaire d'un fragment d'une séquence nucléotidique  
25 codant pour ledit ARNm, ou complémentaire d'une séquence nucléotidique dérivée, soit d'une séquence nucléotidique codant pour ledit ARNm, soit d'un fragment de cette dernière, cette séquence complémentaire codant pour une séquence nucléotidique antisens (encore désignée ARNm antisens) susceptible de s'hybrider avec un ARNm codant pour une laccase chez les plantes,

30 ladite transformation étant effectuée notamment à l'aide d'un vecteur selon la revendication 13.

15. Procédé de diminution de la biosynthèse de lignine chez les plantes, et donc de diminution des quantités de lignines produites, par rapport aux  
35 quantités normales de lignines produites chez les plantes, caractérisé en ce qu'il est effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

- au moins une séquence d'ADN selon la revendication 4,

- et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la laccase, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment l'ARNm codant pour la CAD, la CCR ou l'OMT,

ladite transformation étant réalisée:

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant selon la revendication 13, contenant une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 11 ou la revendication 12,

- soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins contient une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 11, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour un ARNm antisens capable de s'hybrider à un ARNm codant pour une autre enzyme que la laccase, telle que définie ci-dessus.

16. Procédé de diminution de la biosynthèse de lignine chez les plantes, et donc de diminution des quantités de lignines produites, par rapport aux quantités normales de lignines produites chez les plantes, caractérisé en ce qu'il est effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

- au moins une séquence d'ADN selon la revendication 3,

- et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une autre enzyme que la laccase, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment une séquence d'ADN codant pour tout ou partie de la CAD, la CCR ou l'OMT,

ladite transformation étant réalisée:

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant selon la revendication 13, contenant la séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 10 ou la revendication 12,

- soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins contient une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 10, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la laccase, telle que définie ci-dessus.

17. Procédé d'augmentation de la biosynthèse de lignine chez les plantes, et donc d'augmentation des quantités de lignines produites par rapport aux quantités normales de lignines produites chez les plantes, caractérisé en ce

qu'il est effectué par transformation du génome de ces plantes, en y incorporant:

- au moins une séquence d'ADN selon la revendication 3,

- et, le cas échéant, au moins une séquence d'ADN codant pour une autre enzyme que la laccase, qui se trouve être impliquée dans une étape de la biosynthèse des lignines chez les plantes, notamment une séquence d'ADN codant pour la CAD, la CCR ou l'OMT,

ladite transformation étant réalisée:

- soit à l'aide d'un vecteur recombinant selon la revendication 13, contenant la séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 10 ou la revendication 12,

- soit à l'aide de plusieurs vecteurs recombinants dont l'un au moins contient une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 13, tandis que l' (ou les) autre(s) vecteur(s) recombinant(s) contien(nen)t une séquence d'ADN codant pour tout ou partie d'une enzyme autre que la laccase, telle que définie ci-dessus.

18. Plantes ou fragments de plantes, notamment cellules, fruits, semences, pollen, transformés par incorporation dans leur génome d'au moins une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 3 ou 4.

19. Polypeptides recombinants, notamment laccases recombinantes, représentés par SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, et SEQ ID NO 6, tels qu'obtenus par transformation de cellules végétales en intégrant de façon stable dans leur génome, une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 10, notamment à l'aide d'un vecteur selon la revendication 13.

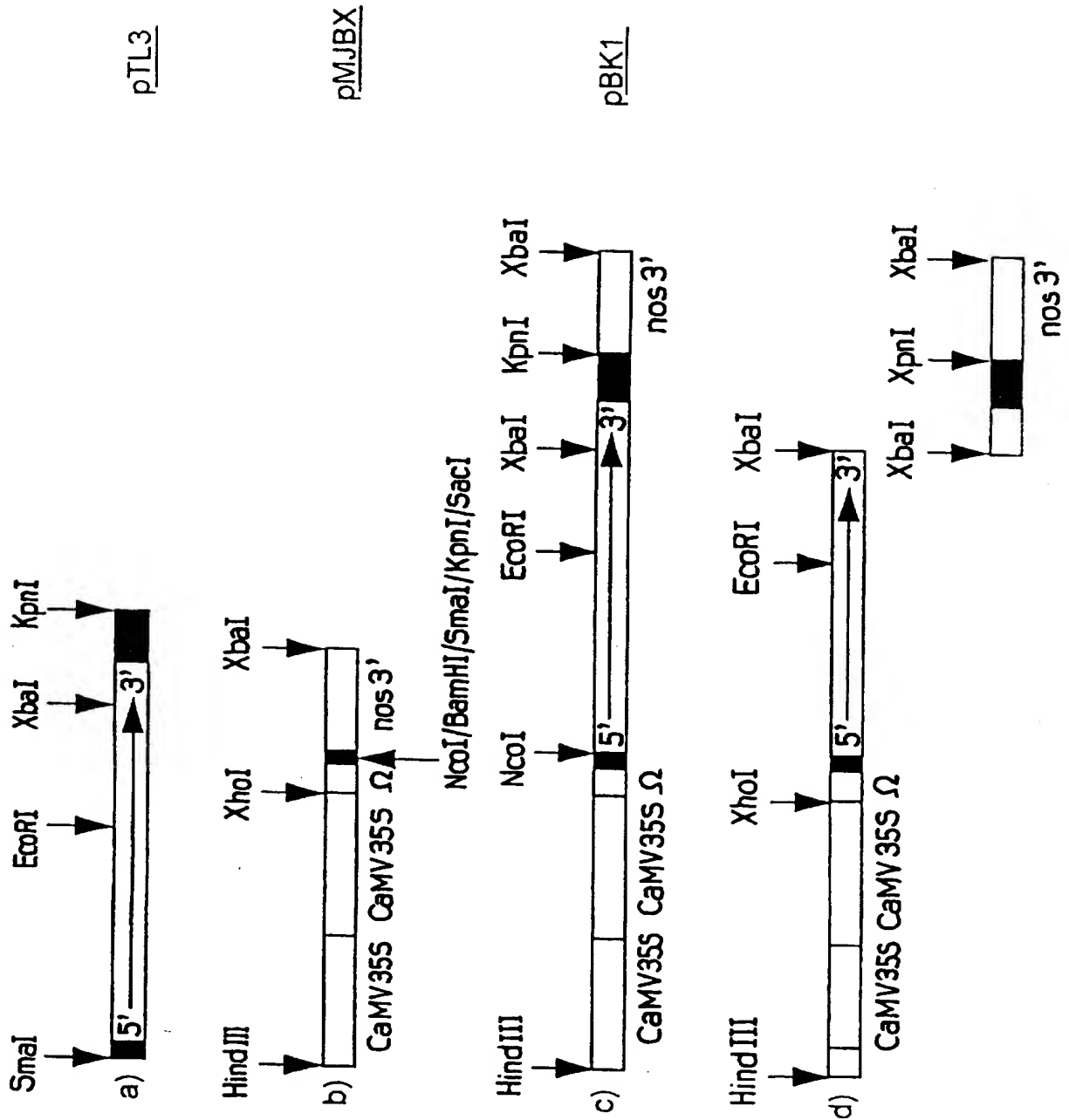


Figure 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

2 / 11

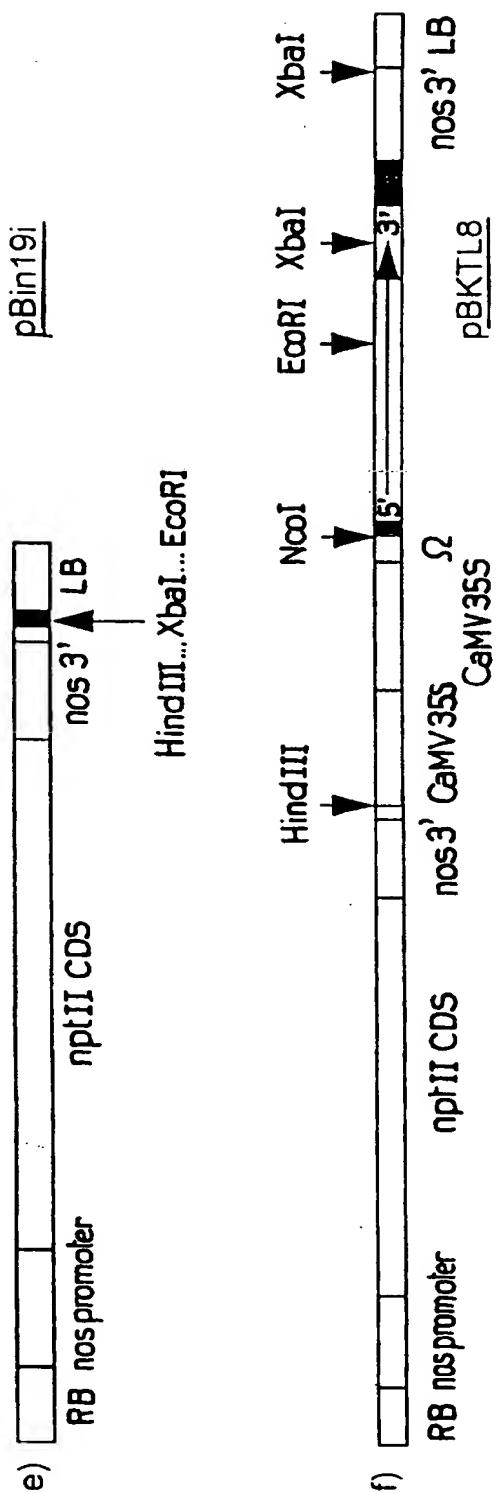
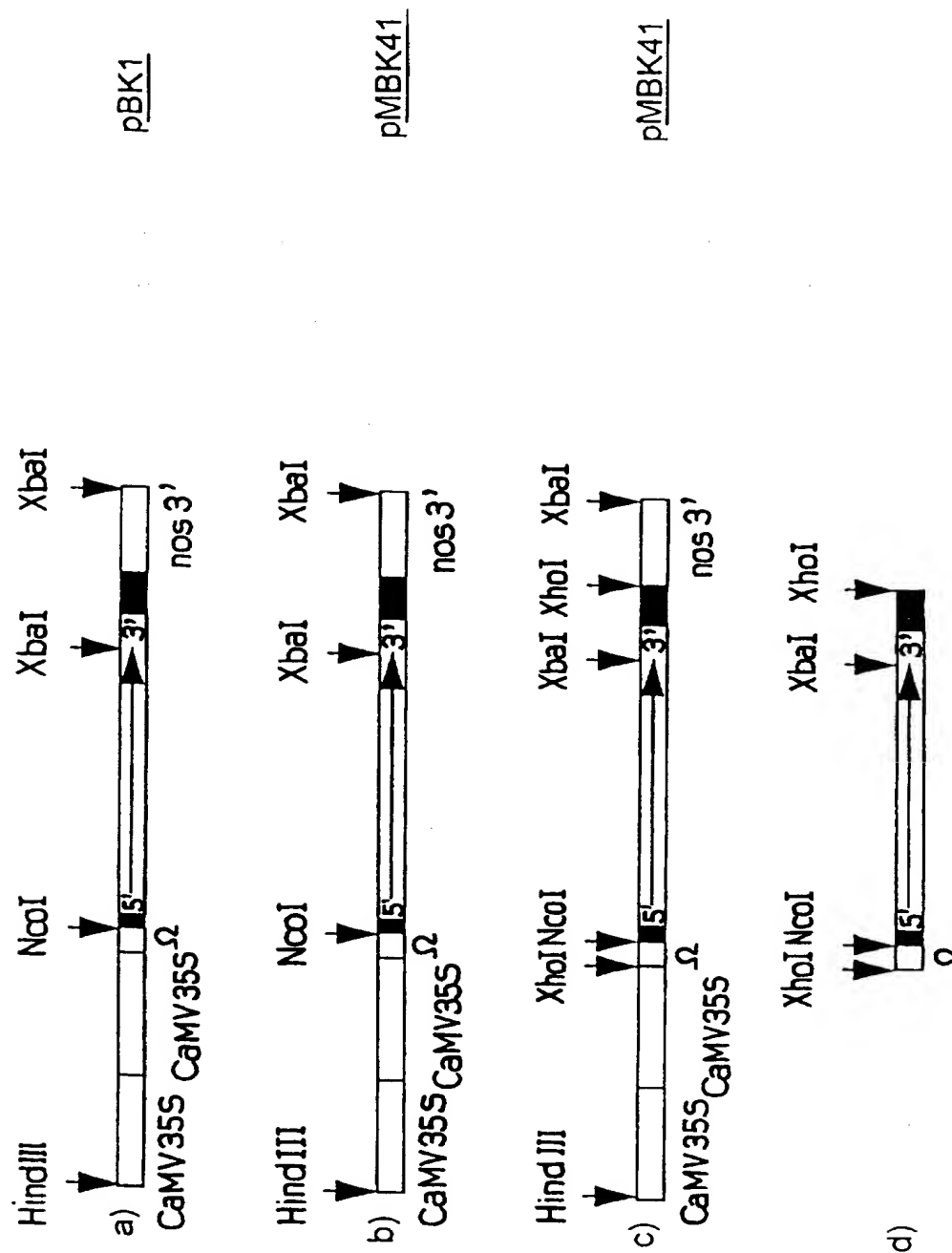


Figure 1 (suit )

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



Figur 2



4 / 11

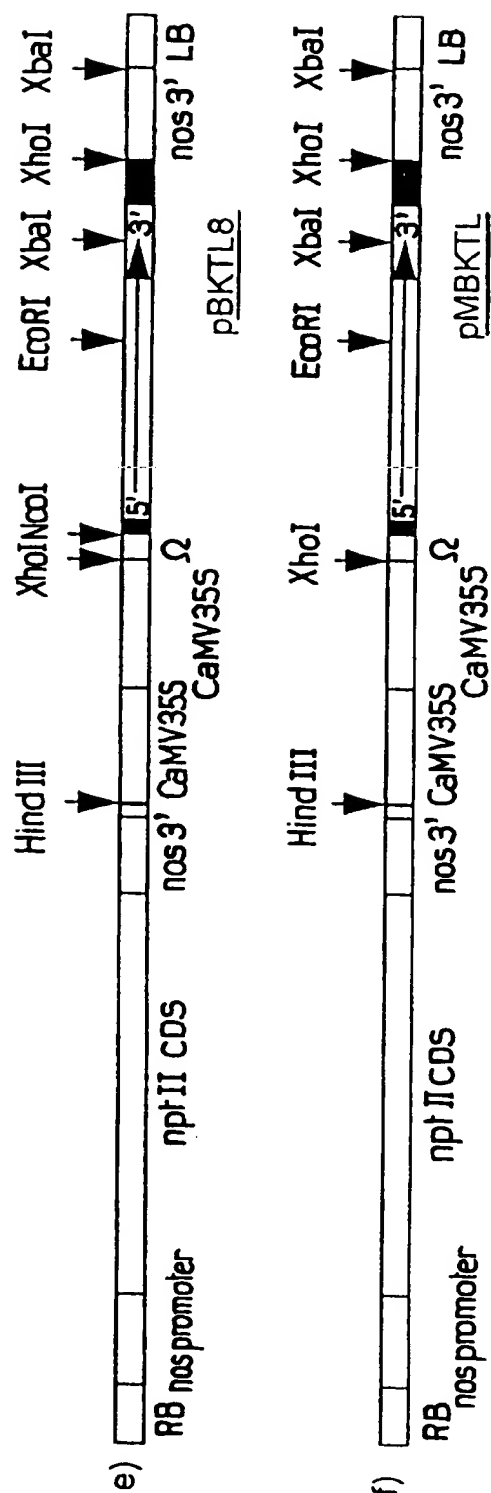
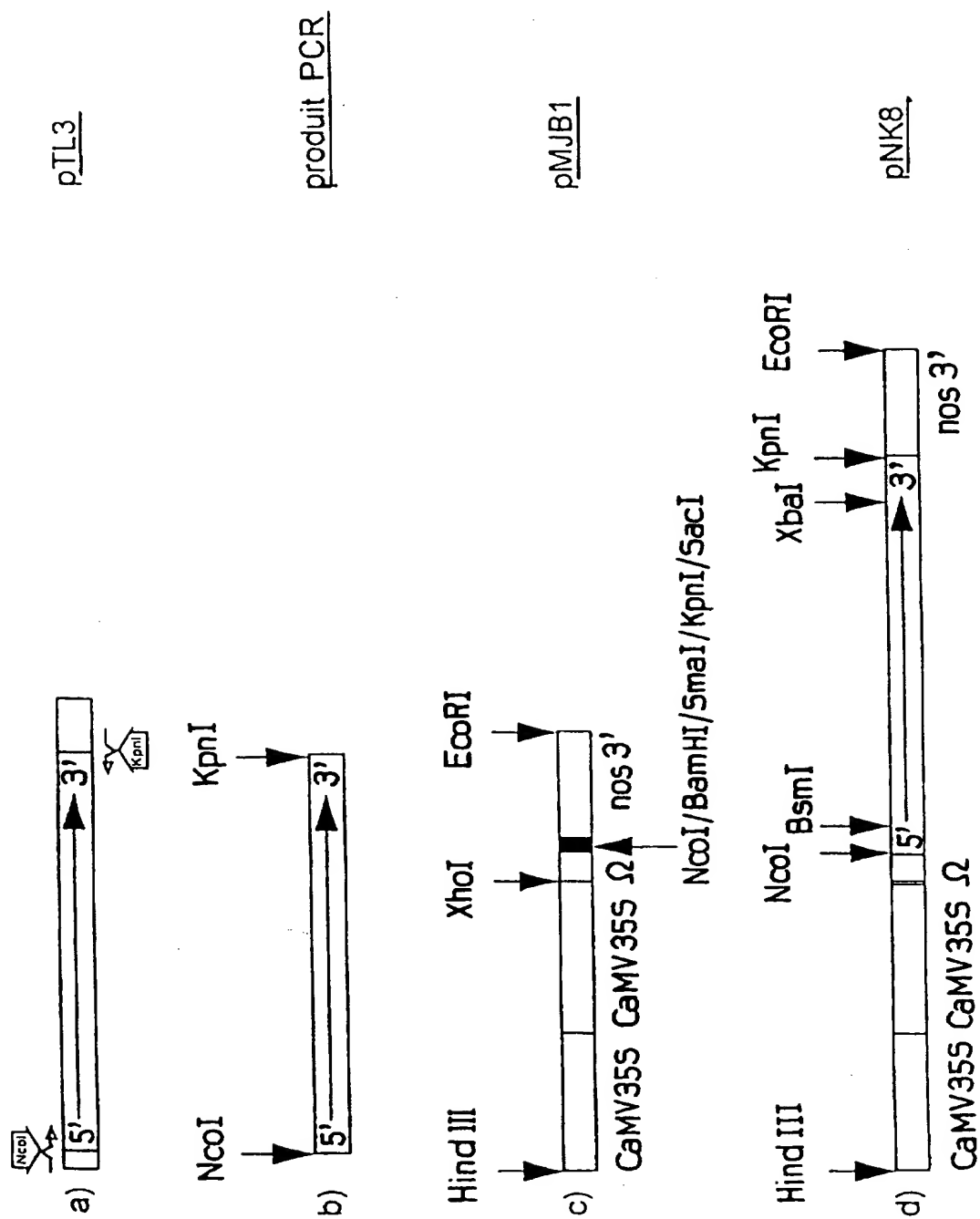


Figure 2 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



### Figure 3

**FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)**

6 / 11

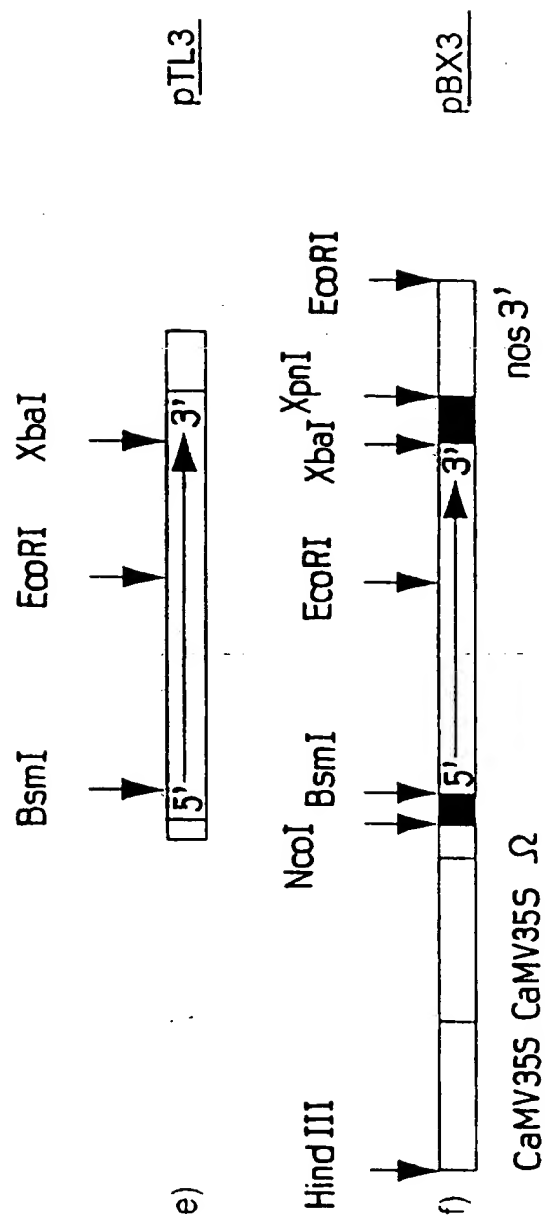


Figure 3 (suite 1)

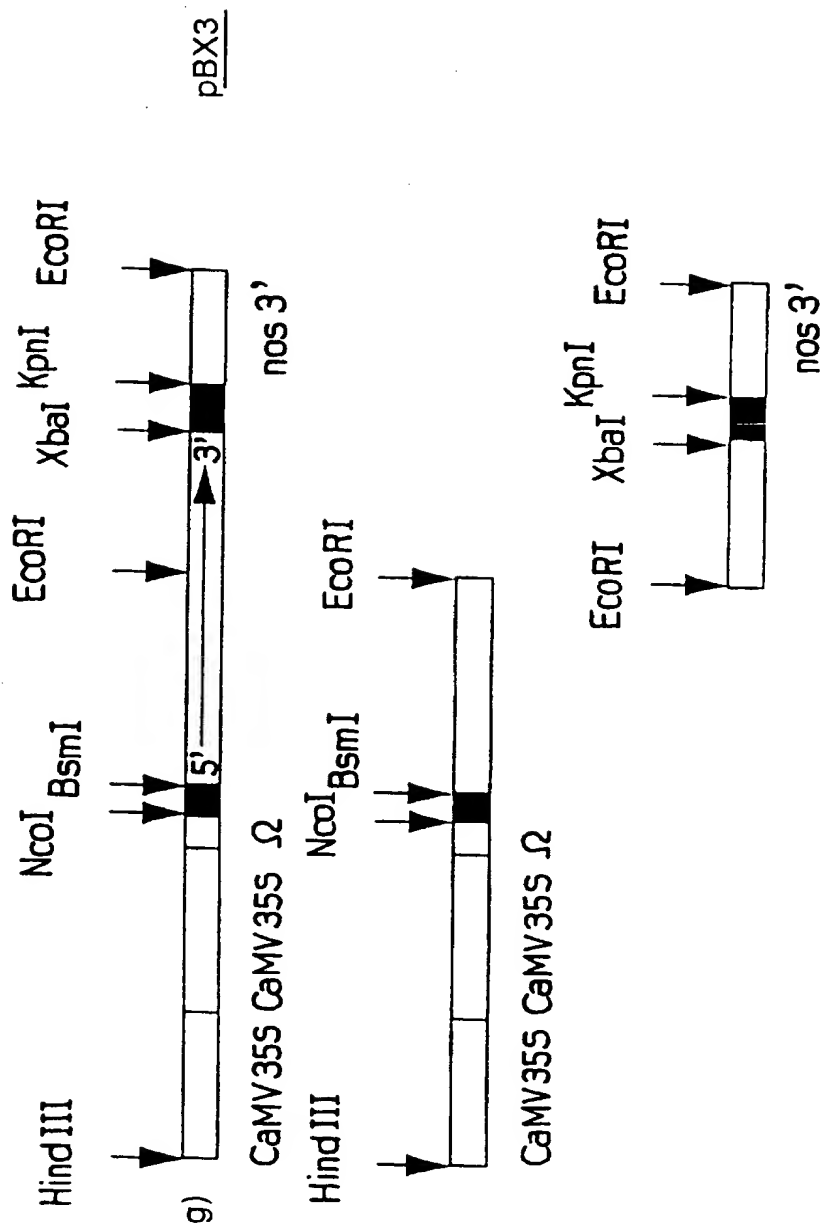
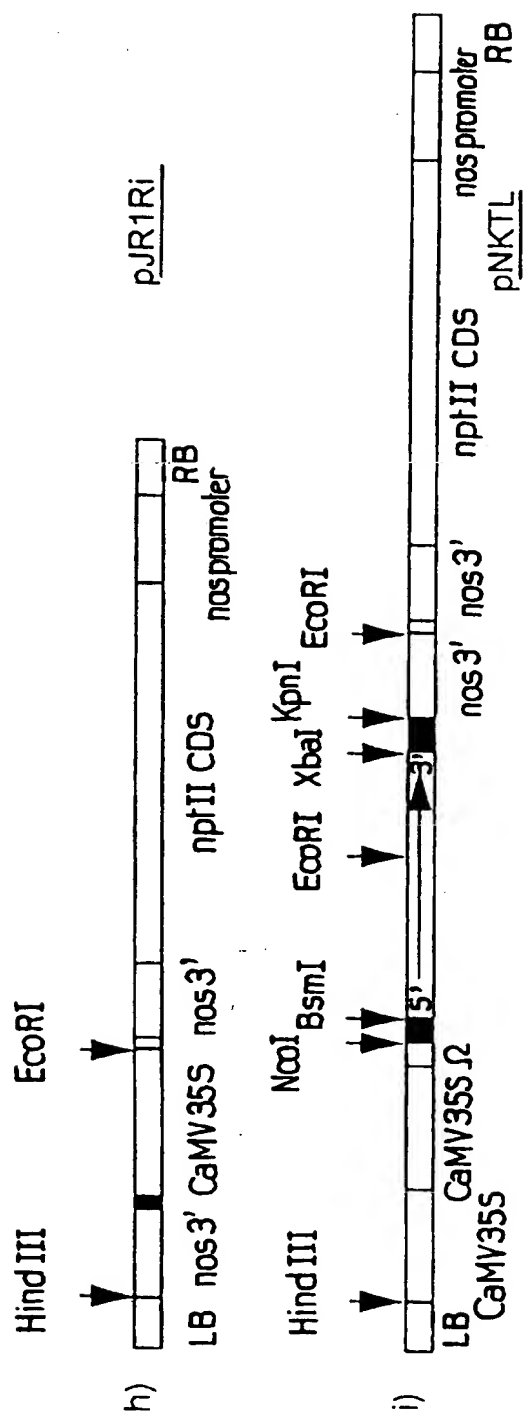


Figure 3 (suite 2)

8 / 11



Figur 3 (suite 3)

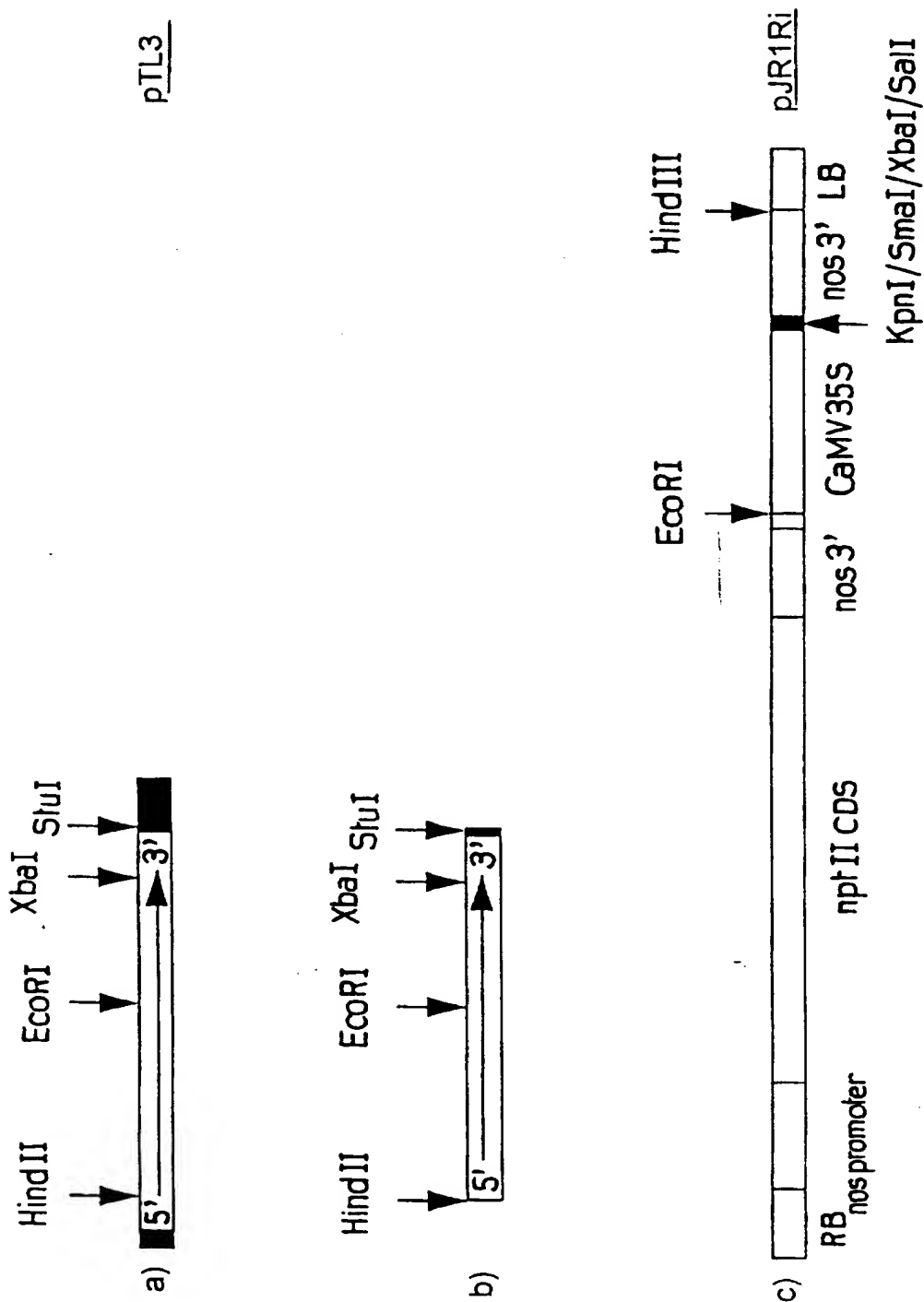


Figure 4

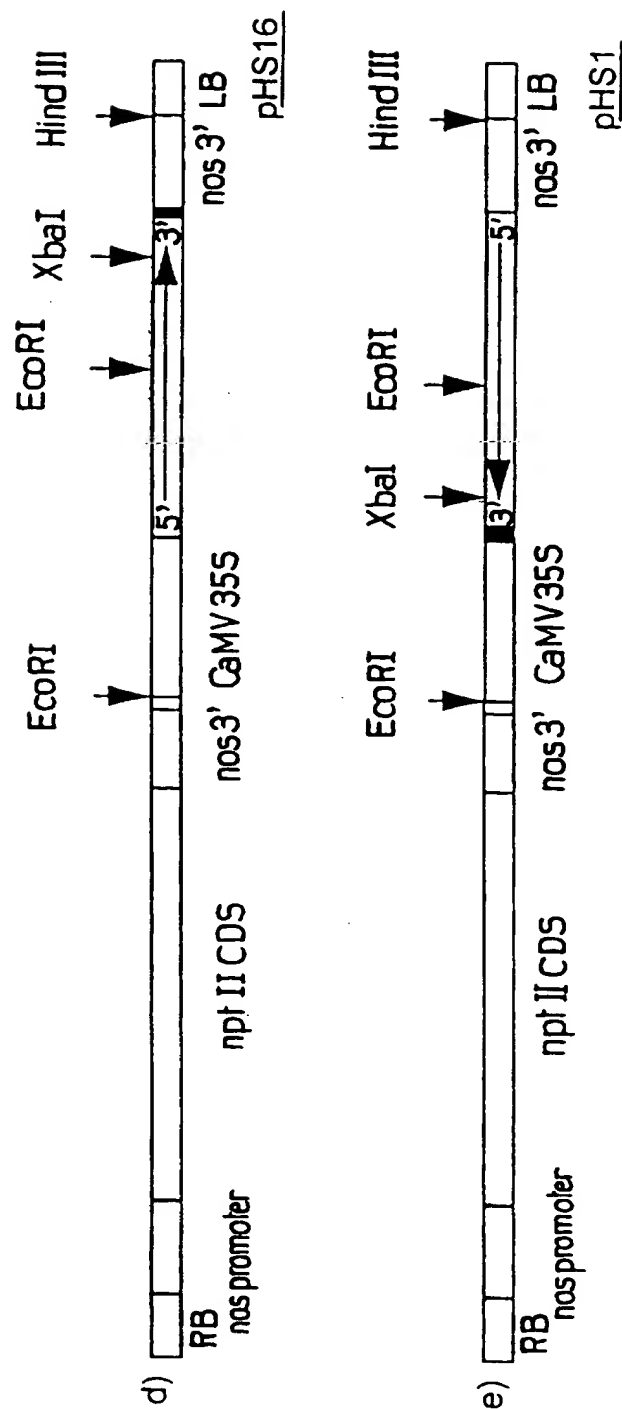


Figure 4 (suite)

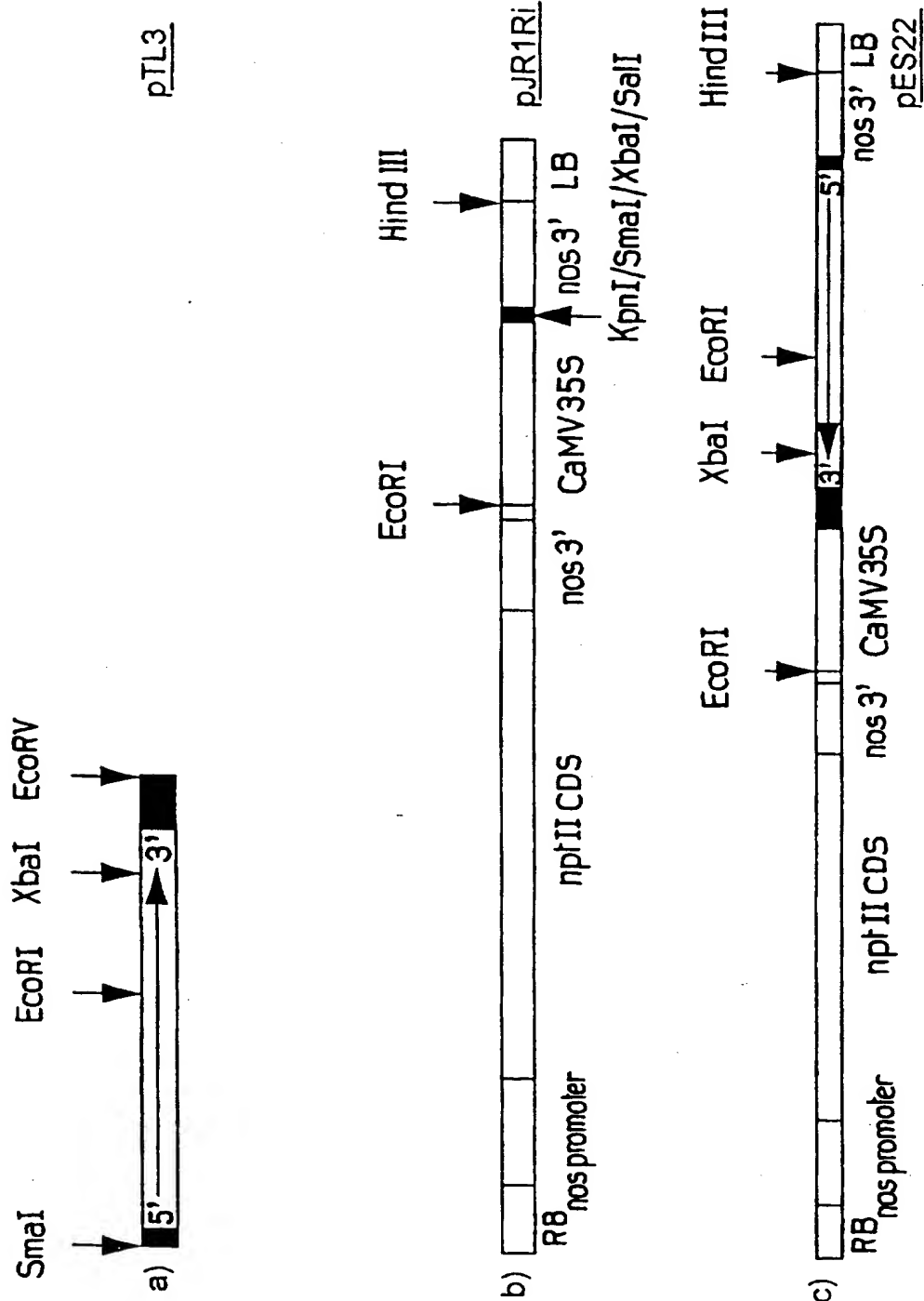


Figure 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 97/00948

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 C12N15/82 C12N15/53 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOUDET, A.M., ET AL.: "Lignin genetic engineering" MOLECULAR BREEDING, vol. 2, 1996, pages 25-39, XP002025844 see page 35  ---  -/--	1-6, 8-11,13, 14,18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 October 1997

Date of mailing of the international search report

28.10.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00948

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAFAYETTE, P.R., ET AL.: "Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an acidic laccase from sycamore maple ( <i>Acer pseudoplatanus</i> L.)" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 107, no. 2, February 1995, pages 667-678, XP002025845 see the whole document -& "Acer pseudoplatanus laccase mRNA, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE REL. 40, 22-AUG-1994, ACCESSION NO. U12757, XP002042794 voir séquence	3-5,7,8, 10,11,19
X	STERJIADES, R., ET AL.: "Laccase from sycamore maple ( <i>Acer pseudoplatanus</i> ) polymerizes monolignols" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 99, 1992, pages 1162-1168, XP002042782 see the whole document	19
X	WO 90 08828 A (PALADIN HYBRIDS INC) 9 August 1990 see examples 3,6,10	4,6,9,11
P,X	KIEFER-MEYER, M.-C., ET AL.: "Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco" GENE, vol. 178, 31 October 1996, pages 205-207, XP002025850 see the whole document	1-19
A	O'MALLEY, D.M., ET AL.: "The role of laccase in lignification" PLANT JOURNAL, vol. 4, no. 5, 1993, pages 751-757, XP002025846 see the whole document	1-19
A	BOUDET, A.M., ET AL.: "TANSLEY REVIEW NO. 80. BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF LIGNIFICATION" NEW PHYTOLOG., vol. 129, 1995, pages 203-236, XP002006037 see page 225 - page 226	1-19

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/FR 97/00948

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KATO, N., ET AL.: "Tobacco mRNA for ascorbate oxidase precursor, ascorbate oxidase." EMBL SEQUENCE DATABASE, RELEASE 41, 30-NOV-1994. ACCESSION NUMBER D43624., XP002025847 * sequence *	7
A	WO 95 27790 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;BOUDET ALAIN (FR); PETTENATI JACQUELINE (F) 19 October 1995 see the whole document	12-18
A	WO 93 05159 A (ICI PLC) 18 March 1993 see the whole document, line 12-18	12-18
A	WO 93 05160 A (ICI PLC) 18 March 1993 see the whole document	12-18
A	WO 94 23044 A (SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATIO) 13 October 1994 see the whole document	12-18
A	BOUDET A M: "Genes involved in monolignol biosynthesis and their manipulation for tailoring new lignins" ABSTR.PAP.AM.CHEM.SOC.:(1996) 211 MEET., PT.1, CHED274 . 11TH ACS NATIONAL MEETING, NEW ORLEANS, LA, 24-28 MARCH, 1996., XP000618488 * abstract *	12-18
A	LAGRIMINI, L.M.: "Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 96, 1991, pages 577-583, XP002025778 see the whole document	17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00948

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9008828 A	09-08-90	AU 1628695 A AU 655574 B AU 5037290 A EP 0456706 A JP 4504355 T US 5356799 A	03-08-95 05-01-95 24-08-90 21-11-91 06-08-92 18-10-94
WO 9527790 A	19-10-95	FR 2718460 A AU 2347295 A CA 2185334 A EP 0755449 A ZA 9502980 A	13-10-95 30-10-95 19-10-95 29-01-97 11-01-96
WO 9305159 A	18-03-93	AU 669106 B AU 1658192 A BR 9205934 A CA 2109222 A EP 0584117 A JP 6509465 T US 5451514 A	30-05-96 05-04-93 05-07-94 27-10-92 02-03-94 27-10-94 19-09-95
WO 9305160 A	18-03-93	AU 663726 B AU 2516792 A BR 9206481 A EP 0603250 A JP 6510429 T	19-10-95 05-04-93 31-10-95 29-06-94 24-11-94
WO 9423044 A	13-10-94	AU 6621194 A	24-10-94

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No  
PCT/FR 97/00948

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/82 C12N15/53 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BOUDET, A.M, ET AL.: "Lignin genetic engineering" MOLECULAR BREEDING, vol. 2, 1996, pages 25-39, XP002025844 voir page 35 --- -/--	1-6, 8-11,13, 14,18

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 octobre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28.10.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LAFAYETTE, P.R., ET AL.: "Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an acidic laccase from sycamore maple (Acer pseudoplatanus L.)" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 107, no. 2, février 1995, pages 667-678, XP002025845 voir le document en entier -& "Acer pseudoplatanus laccase mRNA, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE REL. 40, 22-AUG-1994, ACCESSION NO. U12757, XP002042794 voir séquence	3-5,7,8, 10,11,19
X	STERJIADES, R., ET AL.: "Laccase from sycamore maple (Acer pseudoplatanus) polymerizes monolignols" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 99, 1992, pages 1162-1168, XP002042782 voir le document en entier	19
X	WO 90 08828 A (PALADIN HYBRIDS INC) 9 août 1990 voir exemples 3,6,10	4,6,9,11
P,X	KIEFER-MEYER, M.-C., ET AL.: "Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco" GENE, vol. 178, 31 octobre 1996, pages 205-207, XP002025850 voir le document en entier	1-19
A	O'MALLEY, D.M., ET AL.: "The role of laccase in lignification" PLANT JOURNAL, vol. 4, no. 5, 1993, pages 751-757, XP002025846 voir le document en entier	1-19
A	BOUDET, A.M., ET AL.: "TANSLEY REVIEW NO. 80. BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF LIGNIFICATION" NEW PHYTOL., vol. 129, 1995, pages 203-236, XP002006037 voir page 225 - page 226	1-19

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No

PCT/FR 97/00948

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	KATO, N., ET AL.: "Tobacco mRNA for ascorbate oxidase precursor, ascorbate oxidase." EMBL SEQUENCE DATABASE, RELEASE 41, 30-NOV-1994. ACCESSION NUMBER D43624., XP002025847 * séquence *	7
A	--- WO 95 27790 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;BOUDET ALAIN (FR); PETTENATI JACQUELINE (F) 19 octobre 1995 voir le document en entier	12-18
A	--- WO 93 05159 A (ICI PLC) 18 mars 1993 voir le document en entier, ligne 12-18	12-18
A	--- WO 93 05160 A (ICI PLC) 18 mars 1993 voir le document en entier	12-18
A	--- WO 94 23044 A (SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATIO) 13 octobre 1994 voir le document en entier	12-18
A	--- BOUDET A M: "Genes involved in monolignol biosynthesis and their manipulation for tailoring new lignins" ABSTR.PAP.AM.CHEM.SOC.:(1996) 211 MEET., PT.1, CHED274 . 11TH ACS NATIONAL MEETING, NEW ORLEANS, LA, 24-28 MARCH, 1996., XP000618488 * abrégé *	12-18
A	--- LAGRIMINI, L.M.: "Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 96, 1991, pages 577-583, XP002025778 voir le document en entier -----	17

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 97/00948

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9008828 A	09-08-90	AU 1628695 A	03-08-95
		AU 655574 B	05-01-95
		AU 5037290 A	24-08-90
		EP 0456706 A	21-11-91
		JP 4504355 T	06-08-92
		US 5356799 A	18-10-94
-----			
WO 9527790 A	19-10-95	FR 2718460 A	13-10-95
		AU 2347295 A	30-10-95
		CA 2185334 A	19-10-95
		EP 0755449 A	29-01-97
		ZA 9502980 A	11-01-96
-----			
WO 9305159 A	18-03-93	AU 669106 B	30-05-96
		AU 1658192 A	05-04-93
		BR 9205934 A	05-07-94
		CA 2109222 A	27-10-92
		EP 0584117 A	02-03-94
		JP 6509465 T	27-10-94
		US 5451514 A	19-09-95
-----			
WO 9305160 A	18-03-93	AU 663726 B	19-10-95
		AU 2516792 A	05-04-93
		BR 9206481 A	31-10-95
		EP 0603250 A	29-06-94
		JP 6510429 T	24-11-94
-----			
WO 9423044 A	13-10-94	AU 6621194 A	24-10-94
-----			